

HERBERT SOUSA SOARES

**Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por
carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres
dos estados do Mato Grosso e Pará**

São Paulo

2013

HERBERT SOUSA SOARES

Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dra. Solange Maria Gennari

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2889
FMVZ

Soares, Herbert Sousa
Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará / Herbert Sousa Soares. -- 2013.
118 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Rickettsia*. 2. Anaplasmataceae. 3. Piroplasmida. 4. *Hepatozoon*. 5. Animais silvestres.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará", protocolado sob o n° 1747/2009, utilizando 200 (duzentos) animais silvestres, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no Uso de Animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Research of ticks, tick-borne diseases and trypanosomatids in wild animals from Mato Grosso and Para states", protocol number 1747/2009, utilizing 200 (two hundred) wild animals, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the Use of Animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 10 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOARES, Herbert Sousa

Título: Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

*Dedico este trabalho aos verdadeiros amores
da minha vida, meus pais José Helvecio
Cunha Soares e Lúcia Maria Sousa Soares,
que sempre me apoiaram nessa jornada.*

... “Amor infinito ∞”...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e por me dar força e coragem para superar todo e qualquer tipo de obstáculo;

À minha avó materna, Laudelina Maria de Sousa Lira, *in memoriam*, pelo exemplo de amor, bondade e força;

Aos meus pais, José Helvecio Cunha Soares e Lígia Maria Sousa Soares. Obrigado simplesmente por existirem. Amo vocês mais que tudo;

À minhas tias, Maria do Carmo Soares Cidade (Tia Malú) e Lenir Soares Cavalcante pelo carinho, atenção e apoio todos esses anos;

Aos meus padrinhos, Afonso Celso Soares e Ana Moura Soares por todo carinho, incentivo, atenção e por ter a certeza que posso contar sempre com vocês;

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela confiança no meu trabalho, pela amizade e pelas oportunidades oferecidas. Obrigado por ter me aceitado como seu orientado e por muitas vezes ser uma verdadeira mãe;

Ao Prof^o. Dr. Marcelo Bahia Labruna pelo grande auxílio na execução deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela agradável convivência e bons momentos de risadas;

Ao Prof^o. Dr. Ricardo Augusto Dias pela amizade e colaboração nas análises estatísticas do trabalho.

À Dr^a. Hilda Fátima de Jesus Pena pela amizade, pelos conhecimentos repassados e pelos bons anos de convivência;

À todos os colegas e amigos de pós-graduação, em especial: Amália Barbieri, Aliny Pontes, Jonas Moraes, Igor Acosta, Júlia Lima, Andréa Costa, Thiago Martins, Eveline Zuniga, Giselle Ayres e Cíntia Favero pela amizade, companhia, convívio e por tornarem essa caminhada tão prazerosa durante todos esses anos;

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo que contribuíram de forma significativa para a minha formação;

A todos os funcionários Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Doutorado (Processo nº 2011/13644-8) e pelo Auxílio Financeiro (Processo nº 2010/50839-9)

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

SOARES, H. S. **Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará.** [Research of ticks, tick-borne diseases and trypanosomatids in wild animals from Mato Grosso and Pará states]. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O bioma Amazônia possui uma vasta dimensão territorial e grande abundância e diversidade de espécies e habitats, contudo pouco se sabe sobre a epidemiologia das doenças que acometem os animais silvestres, em especial os que possuem carrapatos como vetores. O presente estudo teve por objetivo fazer o levantamento epidemiológico dos agentes transmitidos por carrapatos (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Coxiella* e *Borrelia*) e tripanossomatídeos (*Trypanosoma* e *Leishmania*) em animais silvestres dos estados do Mato Grosso (MT) e Pará (PA), de fevereiro de 2009 a junho de 2012, incluindo-se mamíferos, aves e répteis. Foram coletadas amostras de tecidos e carrapatos de 181 animais silvestres, sendo 49 do Mato Grosso e 132 do Pará, e estas foram submetidas à extração de DNA, PCR e sequenciamento dos produtos amplificados. Todas as amostras de tecido foram negativas para *Borrelia*, *Coxiella*, *Rickettsia* e Trypanosomatidae. No Mato Grosso, das 49 amostras, 5 (10,2%) foram positivas para o gênero *Hepatozoon*, 5 (10,2%) para ordem Piroplasmida, 4 (8,2%) para *Anaplasma* e 1 (2,0%) para *Ehrlichia*. No Pará, das 132 amostras testadas, 2 (1,5%) foram positivas para *Hepatozoon*, 11 (8,3%) para Piroplasmida, 13 (9,8%) para *Anaplasma* e 3 (2,3%) para *Ehrlichia*. Do total de 232 carrapatos do estado do Mato Grosso testados pela PCR, 139 (59,9%) foram positivos. Dentre os 117 carrapatos procedentes do Pará, 27 (23,1%) foram positivos. As amostras foram sequenciadas, sendo detectadas *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia monteiroi-like*, nas espécies *Amblyomma cajennense*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Amblyomma naponense*, respectivamente, no Mato Grosso, *R. amblyommii* em *Amblyomma longirostre* e *Amblyomma humerale*, *Rickettsia bellii* em *A. humerale* e *A. naponense*, *Rickettsia felis* em *A. humerale* e *Rickettsia c. f. africae* em *A. naponense*. No presente trabalho foram detectados patógenos dos gêneros

Rickettsia e *Hepatozoon*, membros da família Anaplasmataceae e da ordem Piroplasmida em espécies animais e regiões ainda não estudadas, revelando o enorme potencial para pesquisas aplicadas a animais silvestres da fauna Amazônica, cuja literatura ainda é bastante escassa em relação à ocorrência de patógenos, bem como a interação parasita hospedeiro.

Palavras-chave: *Rickettsia*. Anaplasmataceae. Piroplasmida. *Hepatozoon*. Animais silvestres.

ABSTRACT

SOARES, H. S. **Research of ticks, tick-borne diseases and trypanosomatids in wild animals from Mato Grosso and Pará states.** [Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará]. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The Brazilian Amazon biome has a wide territorial dimension and great abundance and diversity of species and habitats, however little is known about the epidemiology of diseases affecting wild animals, especially those with ticks as vectors. This study aimed to survey epidemiological agents transmitted by ticks (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Borrelia* and *Coxiella*) and trypanosomatids (*Trypanosoma* and *Leishmania*) in wild animals in the states of Mato Grosso (MT) and Pará (PA), from February 2009 to June 2012, including mammals, birds and reptiles. We collected tissue samples and ticks from 181 wild animals, 49 of Mato Grosso and Pará 132, and these were submitted to DNA extraction, PCR and sequencing of the amplified products. All tissue samples were negative for *Borrelia*, *Coxiella*, *Rickettsia* and Trypanosomatidae. We tested 49 samples from Mato Grosso and found 5 (10.2%) were positive for *Hepatozoon*, 5 (10.2%) for Piroplasmida, 4 (8.2%) to *Anaplasma* and 1 (2%) to *Ehrlichia*. We tested 132 samples from Pará and found 2 (1.5%) positive for the genus *Hepatozoon*, 11 (8.3%) to order Piroplasmida, 13 (9.8%) for *Anaplasma* and 3 (2.3%) for *Ehrlichia*. Among 232 ticks coming from Mato Grosso, 139 (59.9%) were positive and sequenced, detecting *Rickettsia amblyommii*, *R. rhipicephali* and *Rickettsia monteiroi*-like species in *Amblyomma cajennense* and *A. auricularium*, *Haemaphysalis juxtakochi* and *A. naponense* respectively. The samples tested from Pará (117) 27 were positive and sequenced detecting *R. amblyommii* in *A. longirostre* and *A. humerale*, *R. bellii* in *A. humerale* and *A. naponense*, *R. felis* in *A. humerale* and *Rickettsia* c. f. *africae* in *A. naponense*. In this study were detected pathogens of the genus *Rickettsia* and *Hepatozoon*, family members Anaplasmataceae and order Piroplasmida in animal species and regions not yet studied, revealing the enormous potential for research

applied to wildlife amazon fauna, whose literature is still quite scarce in relation to the occurrence of pathogens and the host parasite interaction.

Keywords: *Rickettsia*. Anaplasmataceae. Piroplasmida. *Hepatozoon*. Wild animals.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 FAUNA SILVESTRE	15
1.2 BIOMA AMAZÔNIA	16
1.3 CARRAPATOS (IXODIDA).....	16
1.4 AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS.....	17
1.4.1 <i>Rickettsia</i> spp.	17
1.4.2 <i>Ehrlichia</i> spp.	20
1.4.3 <i>Anaplasma</i> spp.	21
1.4.4 <i>Hepatozoon</i> spp.	22
1.4.5 <i>Babesia</i> spp.	24
1.4.6 <i>Coxiella</i> sp.	25
1.4.7 <i>Borrelia</i> spp.	26
1.4.8 Tripanossomatídeos (<i>Trypanosoma</i> spp. e <i>Leishmania</i> spp.)	28
2 OBJETIVO	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 COLETA DE AMOSTRAS.....	31
3.1.1 Mato Grosso	31
3.1.2 Pará.....	33
3.2 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS	35
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	35
3.4.1 Tecidos.....	35
3.4.2 Carrapatos	35
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	36
3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	36
3.6.1 <i>Rickettsia</i>	37
3.6.2 <i>Ehrlichia</i>	38
3.6.3 Família Anaplasmataceae.....	38
3.6.4 <i>Hepatozoon</i>	39
3.6.5 Ordem Piroplasmida	39

3.6.6 <i>Coxiella</i>	40
3.6.7 <i>Borrelia</i>	40
3.6.8 Tripanossomatídeos (<i>Trypanosoma</i> spp e <i>Leishmania</i> spp)	41
3.6.9 PCR para o gene mitocondrial ribossômico rRNA 16S de carrapato	42
3.7 LEITURA E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR	45
3.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS	45
3.9 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	46
3.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA	46
4 INFECÇÃO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Rickettsia</i> EM CARRAPATOS E TECIDOS DE ANIMAIS SILVESTRES DA FLORESTA AMAZÔNICA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL.....	47
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.3 RESULTADOS	50
4.3.1 Mato Grosso	50
4.3.2 Pará.....	57
4.3.3 Análise Estatística.....	62
4.3.4 Análises Filogenéticas.....	63
4.4 DISCUSSÃO	65
4.4.1 Ocorrência de carrapatos	65
4.4.2 Infecção por <i>Rickettsia</i> em tecidos	67
4.4.3 Infecção por <i>Rickettsia</i> em carrapatos.....	67
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS.....	69
5 DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS EM ANIMAIS SILVESTRES DO BIOMA AMAZÔNIA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL	72
5.1 INTRODUÇÃO	72
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
5.3 RESULTADOS	74
5.3.1 Mato Grosso	74
5.3.2 Pará.....	79
5.3.3 Análise estatística	82
5.4 DISCUSSÃO	82

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85
6 DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM ANIMAIS SILVESTRES DA FLORESTA AMAZÔNICA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL	87
6.1 INTRODUÇÃO	87
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
6.3 RESULTADOS	90
6.3.1 Mato Grosso	90
6.3.2 Pará.....	94
6.3.3 Análise estatística	95
6.3.4 Análises filogenéticas.....	97
6.4 DISCUSSÃO	100
6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
REFERÊNCIAS	102
REFERÊNCIAS GERAIS	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FAUNA SILVESTRE

No Brasil, estão presentes diversos ecossistemas com gigantesca biodiversidade, contudo a destruição da fauna e flora ocorre em larga escala com consequências desastrosas à vida nos ambientes afetados e ao planeta como um todo. O avanço da agricultura e da pecuária próximo às áreas naturais proporciona um contato mais próximo entre populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitats. Como consequências dessas interações podem ocorrer zoonoses com expansão epidêmica em animais suscetíveis e o aumento da sua disseminação geográfica (BARLETT; JUDGE, 1997). Este estreito contato facilita a disseminação de agentes parasitários e infecciosos para novos hospedeiros e ambientes, estabelecendo-se assim novas relações entre hospedeiros e parasitas, e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão das doenças (CORRÊA; PASSOS, 2001).

A fauna silvestre pode representar uma valiosa fonte de informações em locais nunca antes estudados e estes animais são considerados indicadores de qualidade ambiental, por demonstrarem, através dos agentes que albergam, os desequilíbrios do ambiente a que estão expostos. Por outro lado a saúde e o bom estado nutricional desses animais sugerem boa capacidade de suporte e qualidade ambiental para a sobrevivência da espécie (THOMPSON; KUTZ; SMITH, 2009).

As populações silvestres têm sido consideradas como potenciais reservatórios de agentes patogênicos que podem surgir como agentes emergentes (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2001). Durante os últimos 10 anos, foi demonstrado que as doenças infecciosas e parasitárias podem representar uma séria ameaça à fauna silvestre, podendo causar declínio na sua abundância (CLEAVELAND et al., 2002). Diversos patógenos têm sido responsabilizados por levar populações de animais silvestres à extinção (CLEAVELAND; DYE, 1995) e, por este motivo, a saúde dessas espécies é considerada ponto chave para sua conservação (DEEM et al., 2001; CLEAVELAND et al., 2002).

1.2 BIOMA AMAZÔNIA

A Amazônia é a maior reserva de biodiversidade em fauna e flora do mundo e o maior bioma do Brasil. Ocupando quase metade (49,29%) do território nacional e cobre totalmente cinco estados da região norte (Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), quase totalmente o estado de Rondônia (98,8%) e parcialmente os estados do Mato Grosso (54%), Maranhão (34%) e Tocantins (9%). Possui como característica o clima quente e úmido (com temperatura média de 25 °C), com chuvas torrenciais bem distribuídas durante o ano e rios com fluxo intenso. A vegetação característica desse bioma é do tipo floresta ombrófila densa, normalmente composta de árvores altas (BRASIL, 2010).

O bioma Amazônia possui uma vasta dimensão territorial e grande abundância e diversidade de espécies e habitats, contudo ainda pouco explorado no que diz respeito ao conhecimento científico sobre patógenos que acometem a fauna dessa região. Pouco se sabe sobre a epidemiologia das doenças que acometem os animais silvestres e como esses agentes estão distribuídos nas diferentes espécies, em especial os que possuem carrapatos como vetores.

1.3 CARRAPATOS (IXODIDA)

Os carrapatos são ectoparasitos que pertencem ao filo Arthropoda e a ordem Acari. No mundo, existem aproximadamente 870 espécies de carrapatos, todas agrupadas na subordem Ixodida, que está dividida em três famílias: Ixodidae (carrapatos duros), Argasidae (carrapatos moles) e Nuttalliellidae. A fauna brasileira de Ixodida está atualmente representada por 61 espécies de carrapatos, com algumas espécies importantes para a Saúde Pública e Veterinária por causarem danos diretos durante sua alimentação e por transmitirem agentes infecciosos (fungos, bactérias, vírus e protozoários) aos homens e animais (PAROLA; RAOULT, 2001; BARROS- BATTESTI et al., 2006).

Entre todos os vetores invertebrados conhecidos, os carrapatos ocupam o primeiro lugar em relação ao número de patógenos transmitidos aos animais domésticos e são o segundo grupo de artrópodes ectoparasitos, depois dos

mosquitos, a transmitirem maior variedade de patógenos aos seres humanos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Das 61 espécies de carrapatos descritas no Brasil, 30 espécies pertencem ao gênero *Amblyomma* (DANTAS-TORRES et al., 2009), no entanto, a biologia e ecologia de muitas delas são pouco conhecidas (LABRUNA et al., 2002). A maioria dessas espécies precisa de três hospedeiros para completar o ciclo de vida. Os estágios imaturos geralmente apresentam baixa especificidade parasitária, infestando uma grande variedade de répteis, aves e pequenos mamíferos. Já a especificidade dos adultos é variável dependendo da espécie de carrapato, pois uma mesma espécie pode ser encontrada parasitando tanto animais domésticos quanto silvestres (ESTRADA-PENA; GUGLIEMONE; MANGOLD, 2004).

1.4 AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS

1.4.1 *Rickettsia* spp.

A família Rickettsiaceae é composta por bactérias gram-negativas, aeróbicas e intracelulares obrigatórias (OLANO, 2005; SAHNI; RYDKINA, 2009), que se multiplicam por fissão binária e estão associadas a vetores invertebrados (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; RAOULT et al., 2005). Em seres humanos, causam as doenças conhecidas como tifo endêmico, tifo epidêmico e febre maculosa (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

As riquetsias estão distribuídas em todas as partes do mundo, sendo mantidas na natureza através de vetores artrópodes (carrapatos, piolhos, pulgas e ácaros) e também são capazes de infectar vertebrados, os quais servirão como fonte de infecção para novos vetores (PAROLA; DAVOUST; RAOULT, 2005). Os seres humanos podem adquirir esses microorganismos através do parasitismo do vetor ou pelas fezes dos artrópodes infectados (WEISS; MOULTDER, 1984; YU; WALKER, 2003). Registros dos sintomas de doenças causadas por alguns desses patógenos datam de séculos atrás, como o tifo epidêmico, causado por *Rickettsia prowazekii* e o tifo murino causado por *R. typhi* (RAOULT; ROUX, 1997).

A divisão clássica das riquetsias foi baseada em padrões antigênicos, moleculares e ecológicos, sendo composta por três grupos: 1) grupo do tifo (GT), composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*, cujos principais vetores são insetos (piochos e pulgas, respectivamente); 2) grupo da febre maculosa (GFM), que apresenta mais de 23 espécies válidas, sendo a transmissão associada a carrapatos em sua grande maioria, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente; 3) grupo ancestral (GA), do qual fazem parte outras espécies de riquetsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (YU; WALKER, 2003).

Recentemente, foi proposta outra classificação baseada numa abordagem multigênica, ficando a divisão constituída por cinco dos grupos: 1) GT, composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*; 2) GFM, o maior grupo, representado por mais de vinte espécies; 3) grupo de transição, no qual estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *Rickettsia australis*; 4) grupo Canadensis, representado pela espécie *R. canadensis* e 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* e vários outros genótipos encontrados em insetos (WEINERT et al., 2009).

Na atualidade existem 22 espécies do gênero *Rickettsia* que foram comprovadas como causadoras de infecções no homem, são elas: *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. conorii* subsp. *indica*, *R. sibirica* subsp. *sibirica*, *R. sibirica* subsp. *mongolotimonae*, *R. heilongjiangensis*, *R. slovacae*, *R. marmionii*, *R. raoutii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. australis*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. akari* e *R. felis* (MERHEJ; RAOULT, 2011).

Dentre as espécies de riquetsia a *R. rickettsii* é a mais conhecida e patogênica, sobretudo no Brasil. Possui distribuição restrita às Américas, com registros de casos confirmados no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (LABRUNA et al., 2011). É causadora de uma grave riquetsiose em humanos, chamada no Brasil de Febre Maculosa Brasileira (FMB) ou febre do carrapato. Na Colômbia, Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “Fiebre Manchada” e nos Estados Unidos é conhecida como “Rocky Mountain Spotted Fever” (Febre Maculosa das Montanhas Rochosas). *R. rickettsii* é encontrada multiplicando-se exclusivamente em células endoteliais de humanos, de alguns animais e em células de diferentes tecidos de algumas espécies de ixodídeos, os quais são vetores da doença (WEISS;

MOULDER, 1984). Alguns animais silvestres são reservatórios (hospedeiros amplificadores) dessas bactérias, como os roedores silvestres nos Estados Unidos, e as capivaras e os gambás no Brasil (LABRUNA, 2009).

As espécies *R. africae*, *R. conorii* e *R. sibirica* são, primariamente, do Velho Mundo. Entretanto, *R. africae* foi introduzida nas Ilhas do Caribe (Índias Ocidentais), enquanto *R. parkeri* é encontrada somente no Novo Mundo nas regiões central e sul dos EUA, bem como em algumas porções da América do Sul. Considerando os vetores na Europa, África e Ásia, *R. conorii* e *R. sibirica* têm sua transmissão relacionada principalmente aos carrapatos *Rhipicephalus* spp e *Dermacentor* spp, respectivamente, enquanto que *R. africae* é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, assim como *R. parkeri* nas Américas (GODDARD, 2003).

No mundo, diferentes espécies de carrapatos são incriminadas como vetores das riquetsias nas diferentes localidades geográficas. Nos EUA, os carrapatos vetores são *Dermacentor andersoni* (Stiles), *Dermacentor variabilis* (Say) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (DEMMA et al., 2005; EREMEEVA et al., 2006). No México, as espécies envolvidas na transmissão são *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (BUSTAMANTE; VARELA, 1947) e *Amblyomma imitator* considerado, recentemente, como potencial vetor de *R. rickettsii* ou responsável pela manutenção da bactéria na natureza (OLIVEIRA et al., 2010). No Panamá, Colômbia e Argentina o vetor conhecido é o *A. cajennense* (PATINO-CAMARGO, 1941; PADDOCK et al., 2008). No Brasil, as espécies *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* (Pallas) são vetores comprovados na região metropolitana de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006), onde *R. sanguineus* também é considerado vetor suspeito (LABRUNA, 2009). A espécie *A. cajennense* é a principal espécie de carrapato vetor na América do Sul (LABRUNA et al., 2011).

Outra importante riquetsia é *R. parkeri*, que vem ganhando destaque devido ao aumento no número de casos diagnosticados e também pela taxa de infecção considerável, cerca de 10%, nos carrapatos na natureza quando comparada a *R. rickettsii*, cuja taxa de infecção nos carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum* é de no máximo 1% (SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA, 2009).

O diagnóstico de febre maculosa pode ser feito por métodos sorológicos (HORTA et al., 2007), detecção molecular pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (KIDD et al., 2008) e isolamento do agente em cultivo celular (LABRUNA et al., 2007b).

1.4.2 *Ehrlichia* spp.

Ehrliquiose é uma doença causada por uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória (DUMLER et al., 2001) que infecta animais e o homem em várias partes do mundo (SKOTARCZAK, 2003). Estas bactérias do gênero *Ehrlichia*, por similaridades genéticas, têm sido divididas em três genogrupos: Genogrupo “I” constituído pelas espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*; Genogrupo “II” que inclui *E. phagocytophila* (reclassificada como *Anaplasma phagocytophilum*), *E. equi* e Ehrliquiose granulocítica humana e Genogrupo “III”, constituído por *E. sennetsu* e *E. risticii* (SKOTARCZAK, 2003). No Brasil, são relatadas as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* (ALMOSNY, 1998; MACHADO et al., 2006; LABRUNA et al., 2007a), sendo *E. canis* de maior prevalência nos cães (ALMOSNY, 1998; TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007) e, frequentemente encontrada no carrapato *R. sanguineus* (AGUIAR et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Essas bactérias podem causar duas doenças distintas, a Ehrliquiose monocítica (EM) e a Ehrliquiose granulocítica (EG), acometendo tanto cães quanto humanos (SKOTARCZAK, 2003). A EG é causada por *A. phagocytophilum* (antiga *E. phagocytophila*), entretanto outras espécies, como *E. ewingii*, também estão associadas à EG em cães e humanos (SKOTARCZAK, 2003).

A EM é causada por *E. canis* (em cães) e *E. chaffeensis* (em humanos), sendo transmitidas pelos carrapatos *R. sanguineus* e *Amblyomma americanum*, respectivamente (SKOTARCZAK, 2003). *E. canis* foi primeiramente descrita no Brasil em 1973 (COSTA et al., 1973), sendo o isolamento obtido somente em 2002 (DANTAS-TORRES, 2008). No Brasil é uma doença amplamente distribuída em cães com diversos estudos e diferentes casuísticas (0,7% a 92,3%) e métodos diagnósticos diversos (SPOLIDORIO et al., 2010; VIEIRA et al., 2011).

Na América do Sul, a ehrliquiose humana, causada pelas espécies *E. canis* e *E. chaffeensis*, já foi constatada por diagnóstico molecular na Venezuela (PEREZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2008), e há evidências sorológicas de sua presença na Argentina e no Chile (RIPOLL et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003). No Brasil, há relatos de seres humanos positivos em sorodiagnóstico nos estados de Minas Gerais (CALIC et al., 2004) e Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), utilizando-se antígenos de *E. chaffeensis* ou *E. canis*.

De acordo com pesquisas sorológicas, *E. canis* pode infectar canídeos silvestres, (raposa vermelha - *Vulpes vulpes*) (FISHMAN et al., 2004), que são considerados possíveis reservatórios dessas bactérias nos Estados Unidos (GREENE, 2006). *Ehrlichia ruminantium* é outra espécie que têm como reservatório animais silvestres, infectando ruminantes na África (WALKER; OLWAGE, 1987), e que apresenta sequência gênica de proteínas externas de membrana semelhante a *E. canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma platys* (antiga *E. platys*) (DUMLER et al., 2001).

Ehrlichia ruminantium infecta ruminantes domésticos e silvestres na África e nas Ilhas do Caribe (ALLSOPP, 2010), sendo considerada um agente zoonótico, baseado em diagnóstico molecular em casos de óbito por ehrliquiose (LOUW; ALLSOPP; MEYER, 2005). É transmitida por aproximadamente 20 espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente por *A. variegatum* e *A. haebreum* na África (BARRÉ; UILENBERG, 2010). As espécies de *A. maculatum* e *A. cajennense* demonstraram capacidade de transmissão em condições laboratoriais, mas até o momento não foram implicados como vetores (WALKER; OLWAGE, 1987). No Brasil, em estudos com cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (ALMEIDA et al., 2013) e onça pintada (*Panthera onca*) (WIDMER et al., 2011) foram detectadas, através de diagnóstico molecular, possíveis novas espécies de *Ehrlichia*, sendo o primeiro estudo com detecção em tecidos, e o último em sangue e em carrapatos que parasitavam os felídeos.

O diagnóstico de ehrliquiose pode ser realizado através de esfregaço sanguíneo, citologia corada pelo corante Giemsa, sorologia, cultura de organismos, imunoaglutinação e detecção molecular (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

1.4.3 *Anaplasma* spp.

Anaplasmosose é uma doença que acomete animais e humanos e é causada por bactérias intracelulares obrigatórias que infectam principalmente células granulocíticas (DUMLER et al., 2001). Existem várias espécies de importância veterinária como *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* e *Anaplasma marginale* em bovinos (BARROS et al., 2005; BARRÉ; UILENBERG, 2010), *A. platys* em cães (DANTAS-

TORRES, 2008) e *A. phagocytophilum* em cães, humanos, gatos e cavalos (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003; GREENE, 2006).

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria de caráter zoonótico, transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* (WALKER; DUMLER, 1997; OHASHI et al., 2005), que infecta neutrófilos e causa a erliquiose granulocítica (EG) que apresenta distribuição principalmente no hemisfério norte (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003), onde a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) é incriminada como reservatório por apresentar uma alta ocorrência (51%) de animais soropositivos (GABRIEL et al., 2009).

Em cães, os sinais de EG são inespecíficos e incluem anorexia, letargia, febre, vômito, anemia crônica e poliartrite (SKOTARCZAK, 2003). Na América do Sul, casos de *A. phagocytophilum* em cães foram demonstrados pela técnica de PCR na Venezuela (SUksAWAT et al., 2001). No Brasil, a anaplasmosose de maior importância para cães é a causada pela *A. platys*, amplamente distribuída e, geralmente, associada a infecções concomitantes com outros patógenos, tais como *E. canis* e *Babesia vogeli*. O vetor do *A. platys* ainda não está bem elucidado, mas a possibilidade do *R. sanguineus* estar envolvido na transmissão vem sendo estudada (DANTAS-TORRES, 2008).

O diagnóstico da anaplasmosose é realizado por análises sorológicas, cultivo do organismo, PCR ou mesmo pela visualização do agente parasitando plaquetas em esfregaço de sangue periférico (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

1.4.4 Hepatozoon spp.

O gênero *Hepatozoon* compreende mais de 300 espécies de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa (ALMOSNY, 2002; EWING; PANCIERA, 2003), acometendo grande variedade de animais domésticos e silvestres (VICENT-JOHNSON; MACINTIRE; BANETH, 2003). A hepatozoonose canina é causada por duas diferentes espécies, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* (VICENT-JOHNSON; MACINTIRE; BANETH, 2003). No Brasil, a principal espécie é *H. canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e de baixa patogenicidade nos cães domésticos (RUBINI et al., 2005). A infecção ocorre pela ingestão do carrapato

contendo oocistos maduros (ALMOSNY, 2002; DANTAS-TORRES, 2008). Outras espécies de carrapatos associados à provável transmissão de *Hepatozoon* no Brasil são: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *A. cajennense* (O'DWYER et al., 2001; FORLANO et al., 2005; RUBINI et al., 2009).

Nos Estados Unidos, a hepatozoonose canina é causada pela espécie *H. americanum*, geneticamente distinta da *Hepatozoon canis*, transmitida pelo carrapato *A. maculatum* (EWING; PANCIERA, 2003; GREENE, 2006). Além da diferença genética entre *H. canis* e *H. americanum*, também há diferenças na fisiopatologia de cada agente. Estes dois protozoários infectam leucócitos e são observados nas formas de gamontes nestas células, já a fase de merogonia e gamogonia ocorre em monócitos nas infecções por *H. americanum* e em neutrófilo por *H. canis*. Outra diferença está nas formas de merontes, que apresentam morfologia e localização distintas entre essas espécies (EWING; PANCIERA, 2003).

No Brasil, esta doença foi primeiramente relatada nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (MASSARD, 1979), através de diagnóstico direto em esfregaço sanguíneo. A infecção foi descrita em cães, utilizando para o diagnóstico técnicas sorológicas e moleculares, em São Paulo (GONDIM et al., 1998; RUBINI et al., 2008), Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2009), Minas Gerais (MUNDIM et al., 1992; MUNDIM et al., 2008), Rio de Janeiro (FORLANO et al., 2007) e Natal (PEREIRA et al., 2013).

A hepatozoonose acomete tanto animais domésticos, como cães (PALUDO et al., 2005) e gatos (BANETH et al., 2013), quanto animais silvestres, como felídeos neotropicais (METZGER et al., 2008), chacais e hienas (CARLTON; MCGAVIN, 1998) e répteis (VILCINS et al., 2009). As manifestações clínicas podem variar desde assintomático, principalmente em animais silvestres (RUBINI et al., 2006) até casos de anorexia, diarreia, alterações pulmonares, hipertermia, anemia e apatia ou prostração (GONDIM et al., 1998; MUNDIM et al., 2008).

O diagnóstico de *Hepatozoon* foi realizado em canídeos silvestres em diferentes partes do mundo, como o cão silvestre africano (*Lycaon pictus*) (MATJILA et al., 2008), a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (GIMENEZ et al., 2009), o coioote (*Canis latrans*) (DAVIS; ROBINSON; CRAIG, 1978; KOCAN et al., 1999), o chacal de dorso negro (*Canis mesomelas*) (McCULLY et al., 1975). No Brasil, foi diagnosticado em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (ANDRÉ et al., 2010) e em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) nos

estados de São Paulo (ALENCAR; KOHAYGAWA; SANTARÉM, 1997; ANDRÉ et al., 2010), Espírito Santo (ALMEIDA et al., 2013) e Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006), e em felídeos silvestres (METZGER et al., 2008; WIDMER et al., 2011). Diferentes genótipos de *Hepatozoon* têm sido descritos em cães (PALUDO et al., 2005), e canídeos silvestres (ANDRÉ et al., 2010) do Brasil.

O diagnóstico de hepatozoonose é baseado nos sintomas clínicos, visualização dos gamontes parasitando leucócitos (parasitológico direto através de esfregaço sanguíneo), biópsia, imunohistoquímica, sorologia e PCR (EWING; PANCIERA, 2003; KARAGENC et al., 2006; LI et al., 2008).

1.4.5 *Babesia* spp.

A babesiose é uma doença cosmopolita, causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia*, família Babesiidae, ordem Piroplasmida e Filo Apicomplexa (IRWIN, 2009), que infectam eritrócitos levando à hemólise das hemácias (ALMOSNY, 2002; TABOADA; LOBETTI, 2006). Na última década, com base em análises moleculares, a espécie *B. canis* foi subdividida em três subespécies geneticamente distintas: *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli* (ALMOSNY, 2002; IRWIN, 2009). No Brasil, a espécie de maior prevalência em cães é a *B. canis vogeli* (PASSOS et al., 2005; TRAPP et al., 2006; COSTA-JÚNIOR et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2010).

A babesiose é transmitida por carrapatos ixodídeos, sendo *Babesia canis canis* transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*; *Babesia canis rossi* pelo *Haemaphysalis leachi* e *Babesia canis vogeli* pelo *Rhipicephalus sanguineus* (TABOADA; LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009). Em felinos as espécies relatadas são *Babesia felis*, *Babesia cati*, *Babesia canis presentii* e *Babesia herpailuri* (ALMOSNY, 2002; TABOADA; LOBETTI, 2006). Em humanos é uma doença febril aguda que pode ser confundida com malária e por vezes fatal (ALMOSNY, 2002), podendo ser causada por diversas espécies como *Babesia microti*, *Babesia divergens*, "*Babesia divergens-like*", entre outras (TABOADA; LOBETTI, 2006). No Brasil, há somente um relato com diagnóstico direto de babesiose humana, porém sem confirmação molecular (ALECRIM et al., 1983).

Estudos em animais silvestres têm demonstrado, através de detecção molecular, infecção por *B. microti-like* em diversas espécies de canídeos como raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) na América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2010); *B. canis rossi* em cão silvestre africano (*Lycaon pictus*) na África do Sul (MATJILA et al., 2008). No Brasil, existem relatos de *Babesia* sp. em raposa do campo (*Pseudalopex vetulus*) (MARTINS et al., 2006), em graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) (RUAS et al., 2003), em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (SERRA-FREIRE et al., 1993) e em cachorro-do-mato (PARAENSE; VIANNA, 1948), nos quais foi utilizado exame parasitológico direto, através de esfregaço sanguíneo, como método de diagnóstico, contudo não há confirmação através de técnicas moleculares.

O diagnóstico pode ser realizado através visualização microscópica do agente parasitando eritrócitos, em esfregaço de sangue periférico e, também são empregadas técnicas de detecção sorológica e moleculares (TABOADA; LOBETTI, 2006).

1.4.6 *Coxiella* sp.

O gênero *Coxiella* é constituído por pequenas bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias (SCOLA, 2002), pertencentes à ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae (MAURIN; RAOULT, 1999), agente causador da doença zoonótica conhecida como Febre Q (PAROLA; RAOULT, 2001; KAZAR, 2005), que acomete humanos e animais domésticos e silvestres (MAURIN; RAOULT, 1999).

A única espécie descrita é *Coxiella burnetii*, amplamente distribuída, com exceção das regiões da Antártica (WOLDEHIWET, 2004). Casos de Febre Q por sorodiagnóstico no Brasil já foram relatados nos estados de Minas Gerais (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2005) e Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2009) e pela técnica de imunoistoquímica em São Paulo (SICILIANO et al., 2008).

Apesar de existirem dados soro epidemiológicos sobre a ocorrência da *Coxiella*, estes são raros e os casos são sub diagnosticados (SICILIANO et al., 2008). O diagnóstico é baseado em achados clínicos, sorológicos e achados de necrópsias (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2006). No Brasil, a infecção por *C.*

burnetii em humanos foi recentemente relatada no país através de detecção molecular no Rio de Janeiro (LEMOS et al., 2011).

Mais de 40 espécies de carrapatos podem ser responsáveis por albergar e difundir *C. burnetii* (KAZAR, 2005). Os principais vetores desse agente pertencem ao gênero *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Dermacentor* (PAROLA; RAUOLT, 2001), transmissores da Febre Q para os animais e não para o homem (KAZAR, 2005). A principal forma de transmissão para os seres humanos é por aerossóis, contato com leite, fezes e urina, ou fluidos de animais infectados expelidos no parto (MARRIE, 1990; WOLDEHIWET, 2004). A manifestação clínica em humanos pode variar desde casos agudos, com alterações pulmonares, a casos crônicos, com desenvolvimento de endocardite e hepatite (HEINZEN; HACKSTADT; SAMUEL, 1999). A maioria dos animais, frequentemente não manifesta sintomatologia clínica (MARRIE, 1990). Variações genéticas de *Coxiella* têm sido descritas em amostras de caprinos, ovinos, humanos (MAURIN; RAOULT, 1999) e carrapatos (REEVES et al., 2006).

1.4.7 *Borrelia* spp.

A doença de Lyme é uma enfermidade causada por bactérias espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, o qual é composto por pelo menos 11 espécies taxonomicamente reconhecidas. Destas, as espécies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* e *Borrelia afzelli* são as de maior patogenicidade, estando associadas às diferentes manifestações clínicas da doença de Lyme em humanos e animais domésticos. As demais espécies deste complexo (*Borrelia andersonii*, *Borrelia bissetii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia japonica*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdae* e *Borrelia sinica*) são consideradas minimamente patogênicas ou não patogênicas para humanos. Todas estas 11 espécies que compõe o complexo *B. burgdorferi* sensu lato apresentam em comum o fato de terem sido relatadas em regiões temperadas do hemisfério Norte, onde estão associadas, na natureza, com carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*. Dentro deste complexo, destacam-se as espécies *I. ricinus* e *I. persulcatus* na Europa e Ásia e *I. scapularis* e *I. pacificus* na América do Norte (STEERE et al., 2004).

A borreliose de Lyme acomete cervídeos, embora raramente estes adoecem. Os cervídeos atuam como reservatórios de *Borrelia* sp. mantendo a espiroqueta no ambiente silvestre (STEERE; GRODZICKI; KORNBLATT, 1983; STEERE, 1989; COYLE, 1993; MAGNARELLI et al., 1995a). Na América do Norte, o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) é o principal reservatório (BOSLER, 1993; MAGNARELLI et al., 1995), embora outras espécies também possam atuar como *Cervus nippon yesoensis* (KIMURA et al., 1995), sendo essas espécies considerados sentinelas epidemiológicas desta enfermidade (GILL et al., 1994).

Os roedores também possuem um estreito relacionamento com os microrganismos do gênero *Borrelia*, atuando como principais reservatórios e carreadores de *B. recurrentis* lato sensu, transportando-a do ambiente silvestre ao peri domiciliar (BRUMPT, 1927; PAVLOVSKY, 1965; BARBOUR; HAYES, 1986), porém dificilmente adoecem. As espécies do grupo *B. burgdorferi* "lato sensu", na sua maioria, são mantidas na natureza pelos roedores silvestres (BURGESS et al., 1986; MASUZAWA et al., 1995; JAENSON; TALLEKLINT, 1996). O roedor da pata branca (*Peromyscus leucopus*) e outros membros do gênero são os reservatórios naturais de *B. burgdorferi* "lato sensu" na América do Norte (LANE et al., 1994; LORD et al., 1994; WALKER et al., 1996).

Na Europa, os roedores envolvidos pertencem, principalmente, ao gênero *Apodemus* (KURTENBACH et al., 1995). Na Ásia, tanto o gênero *Apodemus*, quanto o gênero *Eothenomys* têm participação no ciclo da borreliose de Lyme (MASUZAWA et al., 1995).

Essa doença no ciclo silvestre envolve ainda aves, lagartos e pequenos mamíferos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005), como o esquilo cinzento na América do Norte (NIETO et al., 2010).

Dados clínicos, sorológicos e epidemiológicos sugerem evidências da existência de uma borreliose no Brasil, com características semelhantes à doença Lyme descrita nos EUA, porém o agente etiológico da doença, *B. burgdorferi*, nunca foi isolado no país, seja de casos humanos, carrapatos ou de possíveis animais silvestres reservatórios (MANTOVANI et al., 2007), sendo necessários maiores estudos para confirmar se esta doença realmente exista no Brasil .

O diagnóstico da borreliose pode ser realizado através de pesquisa de anticorpos, isolamento do agente e detecção molecular (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005).

1.4.8 Tripanossomatídeos (*Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp.)

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* pertencem à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (HONIBGERG, 1963). Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida) formam o filo Euglenozoa. Os organismos da ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens: a) Bodonina, que compreende parasitas e espécies de vida livre; b) Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas (CAVALIER-SMITH, 1993).

Os tripanossomatídeos podem ser parasitas monoxênicos ou heteroxênicos e, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, estão distribuídos em onze gêneros: sete gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Angomonas* e *Strigomonas*) quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas, em cujos ciclos ocorrem alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados, insetos fitófagos e um hospedeiro vegetal (*Phytomonas*) (WALLACE, 1966; HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; WALLACE et al., 1983; CAMARGO, 1998; BULAT et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011).

O gênero *Endotrypanum* apresenta espécies exclusivas de preguiças encontradas no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e América Central que, assim como as espécies de *Leishmania*, são transmitidas por flebotomíneos. Preguiça, tamanduá, tatu, roedores e marsupiais são reservatórios de *Leishmania*, com várias espécies infectantes para o homem (SHAW, 1985).

O gênero *Trypanosoma* é constituído por espécies que infectam todas as ordens de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), transmitidas por vários invertebrados hematófagos. As espécies de tripanossomas podem se apresentar sob as formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e, raramente, promastigota em seus ciclos de vida. Estas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994).

Centenas de espécies de tripanossomas foram descritas em mamíferos, com mais de uma espécie podendo infectar o mesmo hospedeiro, muitas vezes em infecções mistas. Apenas *T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* na África e *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas infectam o homem. Com exceção de *T. rangeli*, essas espécies são consideradas patogênicas para o homem. Estes tripanossomas não estão restritos a infecções humanas e se mantêm na natureza no ciclo silvestre, infectando diversas ordens de mamíferos (antropozoonoses). A maioria das espécies de tripanossomas circula apenas no ciclo silvestre (zoonoses) e não são patogênicas para seus hospedeiros. A maior parte das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos (HOARE, 1972; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007).

O gênero *Leishmania* é constituído por cerca de 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens (répteis e mamíferos) transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae. Está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004). *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral do Novo Mundo (COURTENAY et al., 2002), está presente em quase todos os países da América do Sul.

No Brasil, dos canídeos silvestres, somente o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) é considerado reservatório natural da leishmaniose visceral (SHERLOCK, 1996), contudo diversas espécies já foram relatadas com infecção, como lobo guará (*Chysocyon brachyurus*) (CURI, 2006), raposa-do-campo (*Pseudolopex vetulus*) e cachorro-vinagre (*Spheotos venaticus*) (FIGUEIREDO, 2008), além de outros mamíferos como o marsupial *Didelphis marsupialis* (TRAVI, 1998).

O diagnóstico para tripanossomatídeos pode ser realizado através de exame parasitológico direto, pela visualização do agente em esfregaço sanguíneo, do xenodiagnóstico, do isolamento em meio de cultura, detecção molecular e sorológica (DEANE, 1961; GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; UMEZAWA et al., 2009; VALADAS et al., 2010).

2 OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo fazer o levantamento epidemiológico dos agentes transmitidos por carrapatos (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Coxiella* e *Borrelia*) e tripanossomatídeos (*Trypanosoma* e *Leishmania*) em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de animais silvestres de diferentes espécies (mamíferos, aves e répteis) procedentes dos estados do Mato Grosso (MT) e Pará (PA). As amostras foram coletadas de acordo com a autorização ICMBio/SISBio protocolos nº 23225-1 e 21526-1 e mediante a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), protocolo nº 1747/2009.

3.1.1 Mato Grosso

As amostras foram obtidas de animais silvestres caçados e utilizados como alimento pelos índios da etnia Tapirapé, na área da reserva indígena no município de Confresa (10°38'57.0"S/ 51°34'12.6"W) (Figura 1), no período compreendido entre setembro de 2010 e junho de 2012, totalizando três campanhas.

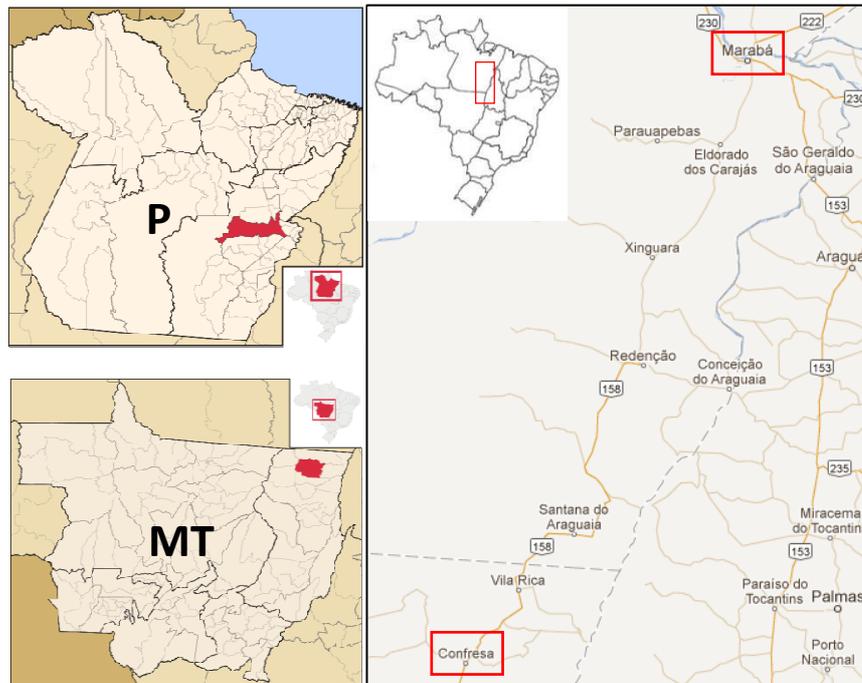
Na reserva estão distribuídas sete aldeias: Urubu Branco (10°40'16.1"S/51°21'13.8"W), Sapeva (10°48'12.2"S/51°17'12.8"W), Córrego da Onça (10°42'27.5"S/51°18'49"W), Buriti II (10°39'33.6"S/51°17'41.2"W), Codebra (10°52'09.6"S/51°15'37.8"W), Xexéu (10°51'20.6"S/51°18'19.8"W) e Santa Laura (10°36'23.9"S/51°10'47.9"W).

A coleta das amostras foi realizada após a chegada dos indígenas caçadores a aldeia, onde os animais eram entregues à equipe de pesquisadores para: identificação da espécie, inspeção para busca e coleta de carrapatos e de tecidos. Logo após o procedimento a caça era então devolvida aos indígenas que as utilizavam como alimento.

Durante a viagem foram ainda coletados carrapatos e fragmentos de tecidos e de animais silvestres encontrados atropelados (Figura 2) na rodovia BR-158, no

trecho entre os municípios de Marabá-PA e Confresa-MT (Figura 1), percorrido pela equipe em todas as viagens.

Figura 1 - Localização geográfica da BR-158 que liga os municípios de Marabá, no estado do Pará (PA) e Confresa, no estado do Mato Grosso (MT)



Fonte: <https://maps.google.com.br/>, (2013)

Figura 2 - Cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) encontrado atropelado na BR-158

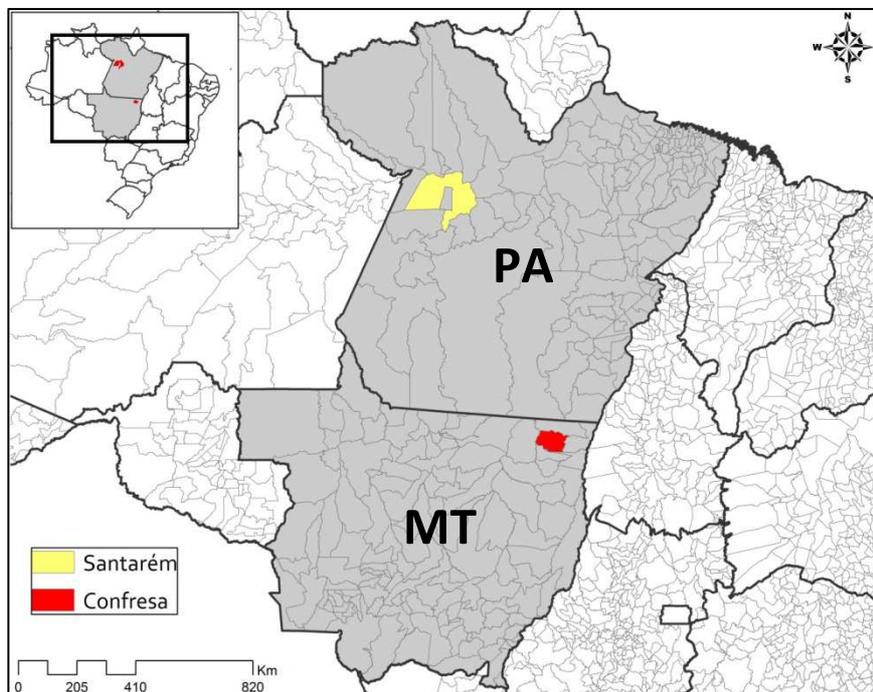


Fonte: Soares, H. S. (2013)

3.1.2 Pará

No estado do Pará, as amostras foram coletadas de animais silvestres atropelados nas rodovias do município de Santarém (Figura 3), no período de fevereiro 2009 a novembro 2011.

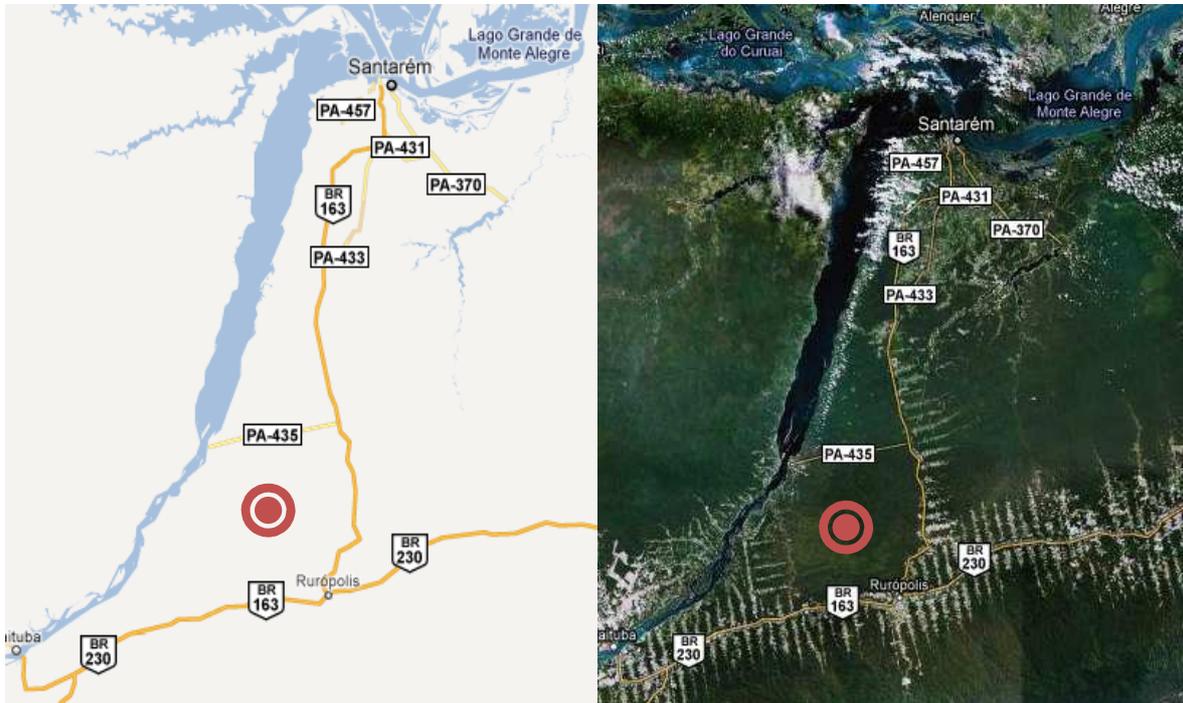
Figura 3 - Mapa da localização geográfica dos municípios de Santarém, no estado do Pará (PA) e Confresa, no estado Mato Grosso (MT)



Fonte: Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística (LEB-FMVZ-USP), (2013)

Os animais silvestres atropelados que ainda estavam em bom estado de conservação, foram recolhidos das rodovias e armazenados em sacos plásticos para posterior identificação e coleta de carrapatos e tecidos. Tais coletas foram realizadas com a colaboração da Polícia Rodoviária Federal e de empresas de ônibus que trafegavam ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217) entre os municípios de Santarém ($2^{\circ}24'52''S$ / $54^{\circ}42'36''W$) e Rurópolis ($4^{\circ}05'44''S$ / $54^{\circ}54'37''W$), onde está localizada a Floresta Nacional do Tapajós, que faz limite com o Rio Tapajós e com a rodovia BR 163 Santarém-Cuiabá, com uma área de aproximadamente 527 mil ha (Figura 4).

Figura 4 - Localização da Floresta Nacional do Tapajós (círculo vermelho), ao longo da BR-163 entre os municípios de Santarém e Rurópolis no estado do Pará



Fonte: <https://maps.google.com.br/>, (2013)

3.2 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os carrapatos foram coletados e armazenados em microtubos, previamente identificados com o código do animal de origem, contendo etanol absoluto para posterior identificação e extração de DNA.

Os fragmentos de órgãos internos (pulmões e baço) foram coletados, armazenados em microtubos e mantidos a 20°C negativos até o processamento. De cada um dos órgãos coletados, foi retirada uma alíquota de aproximadamente dois gramas da parte interna com auxílio de tesoura e pinça individuais. Dessas amostras foram retirados fragmentos menores (200 mg) para extração de DNA e o restante do material foi congelado a 20°C negativos para ser utilizado caso necessário.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS

As espécies de carrapatos, adultos e ninfas, foram identificadas utilizando chaves taxonômicas segundo Barros-Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2010), respectivamente. Para os estágios larvais, as amostras foram submetidas à extração de DNA seguido da PCR e sequenciamento para identificação de espécie, conforme protocolo descrito por Mangold et al. (1998).

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

3.4.1 Tecidos

A extração de DNA dos órgãos foi realizada através de kit comercial (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme as instruções do fabricante. Para cada 20 amostras extraídas foi utilizado um controle negativo (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA).

3.4.2 Carrapatos

Os carrapatos foram submetidos à extração de DNA pelo kit Wizard® DNA Clean-Up System (Cat. A7280 – Promega, Madison, USA), seguindo as orientações do fabricante com modificações.

Na primeira etapa, os carrapatos previamente identificados foram separados individualmente em microtubos de 1,5mL e triturados com auxílio de uma agulha 40X12 estéril acrescido de 150 µL de solução tampão TE pH 8,0 (10mM TRIS HCl; 1mM EDTA). No microtubo foram adicionados 700 µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20mM Tris-HCL pH 8.0; água Milli-Q) e 40 µL de Proteinase K e incubado em termobloco *over night* a 37°C. Após o primeiro passo, os microtubos foram homogeneizados com auxílio de um *vortex* e depois centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm para sedimentação de restos de tecido. O sobrenadante foi

recolhido e separado em duas alíquotas de 300µL cada, sendo uma para extração do DNA e outra de estoque (mantida congelada a 20°C negativos caso fosse necessária uma nova extração). Foi adicionada a primeira alíquota 1mL de resina (fornecida pelo kit), sendo a mistura homogeneizada por 10 segundos e logo após passada por uma seringa acoplada a uma coluna (fornecida pelo kit) com auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida, a coluna foi lavada com 2 mL de isopropanol a 80% e transferida para um microtubo (sem tampa) e centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto para a retirada do excesso de isopropanol. A coluna foi novamente transferida para um último microtubo para eluição do DNA sendo acrescido 50 µL de TE a 70°C. A coluna foi deixada a temperatura ambiente por 1 minuto, e então, novamente centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos para obtenção do DNA, que logo após foi congelado a 20°C negativos até a realização das análises moleculares. Para cada 20 amostras extraídas foi utilizado um controle negativo (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Para avaliação da quantidade de DNA obtido na extração, foi realizada a quantificação nas amostras extraídas em Espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-Vis, ThermoScientific, USA). Todas as amostras com quantidade abaixo de 20 ng/µL de DNA foram re-extraídas.

3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Todas as amostras de tecido (pulmões e baço) foram testadas quanto a presença de DNA de todos os agentes descritos a seguir, utilizando os protocolos 3.6.1 a 3.6.8.

As amostras de carrapatos foram processadas seguindo os protocolos 3.6.1 e 3.6.6, para *Rickettsia* e *Coxiella*, respectivamente. Para identificação das espécies

de carrapato nos estágios larvais as amostras foram testadas segundo protocolo 3.6.9.

As informações dos *primers* utilizados no presente trabalho estão descritos no quadros 1 e 2.

3.6.1 *Rickettsia*

Para pesquisa de riquésias, cada amostra de DNA foi testada por PCR utilizando-se um par de *primers* (CS-78 e CS-323), que amplificam um fragmento de 401 pb do gene *gltA*, presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004b). As amostras positivas para este gene foram testadas por um segundo PCR utilizando-se um par de *primers* (Rr190.70F e Rr190.701R) que amplificam um fragmento de 632 pb do gene *ompA*, presente apenas em riquésias do GFM, conforme previamente descrito (REGNERY et al., 1991; PACHECO et al., 2007). Para cada reação foram utilizados controles negativo (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) e positivo (*Rickettsia parkeri* cepa NOD). Foram utilizados dois outros *primers* para amplificação de fragmentos dos genes *gltA* (CS4-239 e CS4-1069) e *htrA* (17K-5 e 17K-3) que amplificam fragmentos de 834 pb e 549 pb, respectivamente, para melhor caracterização molecular de uma amostra (LABRUNA et al., 2004a,b).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 2,5 µl de DNA extraído acrescido de 22,5 µl de Mix [12,6 µl de água de Milli-Q; 4 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA); 2,5 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA); 1,25 µl de cada primer; 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA); e 0,15 µl de Taq polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA)], para um volume total de 25 µl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf® California, USA), para o gene *gltA* eram: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos à 72°C, e 7 minutos à 72°C. Para o gene *ompA*: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 45 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C. Para o gene *htrA*: 1 ciclo à 94°C

por 3 minutos, seguido por 25 ciclos de 45 segundos à 94°C, 30 segundos à 56°C e 90 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C.

3.6.2 *Ehrlichia*

Na PCR para *Ehrlichia* spp, cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers* DSB-330 senso e DSB-720 anti-senso (DOYLE et al., 2005) que amplifica um fragmento de 401 pb do gene *dsb*, conforme protocolo descrito por Aguiar et al. (2007), com modificações. Para a *heminested* PCR foi utilizado o *primer* DSB-380 senso que amplifica um fragmento de 349 pb do gene *dsb*, conforme Almeida et al. (2013).

Tanto a primeira quanto a segunda PCR foram realizadas em solução total de 50 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. Para a segunda reação (*heminested* PCR), foi utilizado 1µl do produto de DNA amplificado na primeira reação (PCR). As condições dos ciclos da primeira PCR consistiram em uma desnaturação inicial por 3 minutos à 95°C, e 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, e 30 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72°C. Na *heminested* PCR a desnaturação inicial foi a 95°C por 3 minutos, e 30 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, e 30 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72°C. Controles positivo (DNA de cães positivos para *Ehrlichia canis*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

3.6.3 Família Anaplasmataceae

Na PCR para *Anaplasma* spp, cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers* EHR16SD senso e EHR16SR anti-senso para o gene 16S que amplifica um fragmento de 345 pb do gene 16S rRNA de praticamente todos os membros da Família Anaplasmataceae (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000).

A PCR para o gene 16S foi realizado em solução total de 25 µL contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum

TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. As condições térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles positivo (DNA de cães positivos para *Ehrlichia canis*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

3.6.4 Hepatozoon

Para detecção de DNA de *Hepatozoon* spp, foram utilizados os *primers* HEP2 144-169 e HEP2 743-718, que amplifica um fragmento de cerca de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp, conforme protocolo preconizado por Almeida et al. (2012). Para todas as reações foram utilizados controles positivo (DNA de *H. canis* obtido de cão doméstico do Rio Grande do Norte) e negativo (água Milli-Q).

Todas as reações de PCR foram realizadas em solução total de 25 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. Os ciclos de temperaturas da PCR foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C.

3.6.5 Ordem Piroplasmida

Para detecção de hemoparasitas da ordem Piroplasmida foram utilizados os *primers* BAB2 143-167 e BAB2 694-667, correspondentes a regiões conservadas do gene 18S rRNA dos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cythauxzoon*, que amplifica um fragmento de cerca de 551 pb, de acordo com protocolo utilizado por Almeida et al. (2012). Controles positivo (DNA de sangue de equino positivo para *Theileria equi*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

A PCR foi realizada em solução total de 25 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. As condições

dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial utilizada por 5 minutos à 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 58°C, e 30 segundos à 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final à 72°C.

3.6.6 *Coxiella*

Todas as amostras foram testadas para a presença de *Coxiella*, utilizando-se um par de *primers* CAPI-844-F senso e CAPI-844-R anti-senso, que amplifica um fragmento de 601 pb do gene *CAPI* (*capsular polysaccharide biosynthesis protein*) segundo Reeves et al. (2006).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 2,5 µl de DNA extraído, 2,5 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA), 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA), 0,15 µl de Taq Polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA), 4,0 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA), 1,25 µl de cada primer e 12,6 µl de água Milli-Q, totalizando um volume de 25 µl de Mix por microtubo. Para cada reação, foram utilizados controle positivo (*Coxiella burnetti* de cultivo celular – COX Atg 5p) e controle negativo (água Milli-Q).

As condições dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidas de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, extensão inicial a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.7 *Borrelia*

Para verificar a presença de DNA de bactérias do gênero *Borrelia*, as amostras foram testadas com um par de *primers* FlaLL senso e FlaRL anti-senso externos, que amplifica um fragmento de 665 pb do gene *flagelina-B* (*Flab*) e uma segunda reação utilizando um par de *primers* FlaLS senso e FlaRS anti-senso internos (*nested* PCR), que amplifica um fragmento de 354 pb, de acordo com Stromdahl et al. (2003). Para cada reação foram utilizados controles positivo (*Borrelia anserina*) e controle negativo (água Milli-Q).

As duas reações, PCR e *nested* PCR, foram realizadas em microtubos de 200 µl sendo a primeira com volume total de 25 µL e a segunda 50 µL de Mix contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. Para a segunda reação (*nested* PCR) foi utilizado 1 µL da amostra amplificada na primeira reação. Nas duas reações as sequências térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C, com extensão inicial a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.8 Tripanossomatídeos (*Trypanosoma* spp e *Leishmania* spp)

Foram utilizados os *primers* 609F e 706R para a amplificação da região V7V8 SSU rDNA, que são capazes de detectar todos os representantes da família Trypanosomatidae segundo protocolo de Maia da Silva et al. (2004).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 3,0 µl de DNA extraído, 2,5 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA), 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA), 0,15 µl de Taq Polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA), 5 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA), 0,5 µl de cada primer e 12,6 µl de água Milli-Q, totalizando um volume de 25 µl de Mix por microtubo. Para cada reação, foram utilizados controle positivo (*Trypanosoma cruzi marinkellei* de cultivo celular – MOR-19) e controle negativo (água Milli-Q).

As condições dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidas de 29 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 60°C, extensão inicial a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.9 PCR para o gene mitocondrial ribossômico rRNA 16S de carrapato

Para este PCR, foram utilizados os *primers* 16S+ e 16S-, que amplificam um fragmento de 460 pb do gene mitocondrial 16S rRNA de praticamente todas as espécies de carrapatos (MANGOLD et al., 1998).

As condições dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidas de 11 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C, extensão inicial a 72°C por 40 segundos e extensão final a 94°C por 30 segundos.

Quadro 1 - Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de patógenos

(continua)

Gene / Primers	Especificidade	Sequência dos primers (5'-3')	Fragmento Amplificado	Referência
<i>gltA</i>	<i>Rickettsia</i>			
CS 78		F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 pb	Labruna et al., 2004 ^a
CS 323		R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
CS 239		F- GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834 pb	Labruna et al., 2004 ^b
CS 1069		R- CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
<i>htrA</i>	<i>Rickettsia</i>			
17K5		F- GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	549 pb	Labruna et al., 2004 ^a
17K3		R- TGTCTATCAATTCACAACCTTGGCC		
<i>OmpA</i>	Riquétsias GFM*			
Rr 190.70		F- ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	632 pb	Regnery et al., 1991
Rr 190.701		R- GTTCCGTTAATGGCAGCATCT		
<i>Dsb</i>	<i>Ehrlichia</i>			
DSB 330		F- GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401 pb	Doyle et al., 2005
DSB 720		R- CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		
DSB 380		F- ATTTTATAGRGATTTTCCAATACTTGG	349 pb	Almeida et al., 2013
16S	Família Anaplasmataceae			
EHR 16SD		F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345 pb	Inokuma et al., 2000
EHR 16SR		R- TAGCACTCATCGTTTACAG		
18S	<i>Hepatozoon</i>			
HEP2 144-169		F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574 pb	Almeida et al., 2012
HEP2 743-718		R- ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG		

(conclusão)

Gene / Primers	Especificidade	Sequência dos primers (5'-3')	Fragmento Amplificado	Referência
18S	Ordem Piroplasmida			
BAB2 143-167		F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551 pb	Almeida et al., 2012
BAB2 694-667		R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		
CAPI	<i>Coxiella</i>			
CAPI-844F		F- ATTTAGTGGGTTTCGCGCAT	601 pb	Reeves et al., 2006
CAPI-844R		R- CATCAGCATACGTTTCGGGAA		
Flab	<i>Borrelia</i>			
FlaLL		F- ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	665 pb	Stromdahl et al., 2003
FlaRL		R- GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT		
FlaLS		F- AACAGCTGAAGAGCTTGAAT	354 pb	
FlaRS		R- CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
18S	Família Trypanosomatidae			
609		F- CACCCGCGGTAATTCCAGC	900 pb	Maia da Silva et al., 2004
706		R- TTGAGGTTACAGTCTCAG		

* Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa

Quadro 2 - Lista dos primers utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para o gene 16S de carrapato

Gene/ Primers	Especificidade	Sequência dos primers (5'-3')	Fragmento amplificado	Referência
16S	Família Ixodidae			
16S+		F- CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460 pb	Mangold et al. 1998
16S-		R- GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT		

3.7 LEITURA E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR

Todos os produtos da PCR (5 μ L DNA amplificado acrescido de 2 μ l de corante Gel Loading Buffer (Invitrogen® Carlsbad, CA) foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (1,5 mg de Agarose Ultra-Pure Invitrogen® Carlsbad, CA; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (0,1 μ l/mL) e tampão de corrida TBE 0,5X pH 8,0 à 110V/50mA. O gel foi visualizado luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphamager®). As amostras que revelavam bandas de DNA na altura do controle positivo, confirmando a amplificação de nucleotídeos, eram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

3.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), que consiste em Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em microtubos de 500 μ L, previamente identificados, foram adicionados 4 μ L de ExoSAP e 10 μ L da amostra amplificada na PCR, em seguida as amostras foram colocadas no termociclador durante 30 minutos (15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C).

Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit comercial BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com especificações do fabricante, sendo 5 μ L de DNA purificado (concentração máxima de 100 ng), 1 μ L de água Milli-Q, 1 μ L de “Big Dye”, 1 μ L de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/ μ L) e 2 μ L de buffer. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) disponível no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a Sorologia (LaBMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.9 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, Wis.) e submetidas a análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST two sequences analysis) (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

3.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas para os diferentes grupos de patógenos e genes foram alinhadas com diversas sequências disponíveis no GeneBank. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997) e ajustado manualmente no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997). As análises filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). Devido ao número de taxa, a análise foi feita utilizando-se algoritmos heurísticos para a busca da árvore mais parcimoniosa. A opção padrão do PAUP foi utilizada. Os métodos de Parcimônia procuram a árvore que minimize o número de passos (substituição de nucleotídeos ou aminoácidos) para explicar os padrões observados nos dados. A fim de determinar os valores que apoiam cada braço da árvore filogenética utilizamos o método estatístico “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985). Assim, quanto maior o número de vezes que um determinado braço ocorre na estimativa, maior é a confiança da existência deste braço. A matriz de similaridade foi construída utilizando o programa Point Replacer v. 2.0 (<http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>).

4 INFECÇÃO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Rickettsia* EM CARRAPATOS E TECIDOS DE ANIMAIS SILVESTRES DA FLORESTA AMAZÔNICA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* inclui bactérias Gram-negativas e intracelulares obrigatórias, da ordem Rickettsiales na subdivisão alfa da classe Proteobacteria. Várias espécies já foram identificadas em diversos artrópodes terrestres, e mais recentemente em sanguessugas e ameiba (DYKOVÁ et al., 2003; PERLMAN et al., 2006).

Carrapatos são vetores de vários agentes biológicos para seres humanos e animais, podendo causar danos à saúde de seus hospedeiros ou mesmo levar à morte (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999). Entre as doenças transmitidas por carrapatos, as riquetsioses têm recebido atenção especial em todo o mundo e são consideradas uma ameaça global emergente (LIM et al., 2012). No Brasil, as principais espécies de carrapatos vetores de *Rickettsia* pertencem ao gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2001), que estão amplamente distribuídos em todo o país (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Riquetsias do GFM fazem parte de mais de 20 espécies de bactérias que estão, em sua maioria, associadas a carrapatos (PAROLA et al., 2005). Elas mantêm o seu ciclo de vida na natureza entre os carrapatos vetores e algumas espécies de mamíferos, que são conhecidos como hospedeiros amplificadores (BURGDORFER, 1988).

O bioma Amazônia possui uma vasta dimensão territorial e grande abundância e diversidade de espécies e habitats, contudo ainda pouco explorado no que diz respeito ao conhecimento científico sobre patógenos que acometem a fauna dessa região. Pouco se sabe sobre a epidemiologia das doenças que acometem os animais silvestres e como esses agentes estão distribuídos nas diferentes espécies, em especial os que possuem carrapatos como vetores.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

De fevereiro de 2009 a junho de 2012, foram coletados carrapatos e tecidos de animais silvestres de diferentes espécies (mamíferos, aves e répteis) procedentes dos estados do Mato Grosso (MT) e Pará (PA).

No estado do Mato Grosso as amostras foram obtidas de animais silvestres caçados e utilizados como alimento pelos índios da etnia Tapirapé, na área da reserva indígena no município de Confresa (10°38'57.0"S/ 51°34'12.6"W) na qual estão distribuídas sete aldeias: Urubu Branco (10°40'16.1"S/51°21'13.8"W), Sapeva (10°48'12.2"S/51°17'12.8"W), Córrego da Onça (10°42'27.5"S/51°18'49"W), Buriti II (10°39'33.6"S/51°17'41.2"W), Codebra (10°52'09.6"S/51°15'37.8"W), Xexéu (10°51'20.6"S/51°18'19.8"W) e Santa Laura (10°36'23.9"S/51°10'47.9"W). Durante a viagem, para a realização das coletas, foram ainda coletados carrapatos e fragmentos de tecidos e de animais silvestres encontrados atropelados na rodovia BR-158, no trecho entre os municípios de Marabá-PA e Confresa-MT.

No estado do Pará, as amostras foram coletadas de animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217) entre os municípios de Santarém (2°24'52"S/54°42'36"W) e Rurópolis (4°05'44"S/ 54°54'37"W), onde está localizada a Floresta Nacional do Tapajós, que faz limite com o Rio Tapajós e com a rodovia BR 163 Santarém-Cuiabá.

Os carrapatos foram coletados e armazenados em microtubos contendo etanol absoluto para posterior identificação taxonômica dos estágios adultos, ninfas e larvas (MANGOLD et al., 1998; BARROS-BATTESTI et al., 2006; MARTINS et al., 2010), e análises moleculares. Os fragmentos de órgãos internos, pulmões e baço, ou sangue foram coletados, armazenados em microtubos e mantidos a 20°C negativos até o processamento.

A extração de DNA dos órgãos foi realizada através de kit comercial (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme as instruções do fabricante. Os carrapatos foram submetidos à extração de DNA pelo kit Wizard® DNA Clean-Up System (Cat. A7280 – Promega, Madison, USA), seguindo as orientações do fabricante. Para todas as extrações foram inclusos controles negativos (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) para indicar contaminação entre amostras durante o procedimento. O DNA de cada amostra extraída foi quantificado

em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-Vis, ThermoScientific, USA). Todas as amostras com quantidade acima de 20 ng/μL de DNA foram submetidas às análises moleculares pela PCR.

Todas as amostras de tecido, sangue e carrapatos foram testadas quanto à presença de DNA de bactérias do gênero *Rickettsia* e *Coxiella*. Em todas as reações foram utilizados controles negativo (água Milli-Q) e positivo (DNA de *Rickettsia parkeri* e *Coxiella burnetii*) de acordo com agente pesquisado. As informações dos *primers* utilizados no presente estudo estão descritos no quadro 3. Para identificação das espécies de carrapato nos estágios larvais as amostras foram testadas para fragmento do gene mitocondrial ribossômico 16S rDNA de carrapato, conforme Mangold et al. (1998).

Quadro 3 - Lista dos primers utilizados no presente estudo

Gene / Primers	Agente	Sequência dos primers (5'-3')	FA	Referência
gltA	<i>Rickettsia</i>			
CS 78		F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401pb	Labruna et al., 2004 ^a
CS 323		R- CTTCTTAAAATTCATAAATCAGGAT		
CS 239		F- GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834pb	Labruna et al., 2004b
CS 1069		R- CAGGGTCTTCGTGCATTCTT		
htrA	<i>Rickettsia</i>			
17K5		F- GCTTTACAAAATTCTAAAACCATATA	549pb	Labruna et al., 2004 ^a
17K3		R- TGTCTATCAATTCACAACCTGGCC		
ompA	<i>Rickettsia</i> *			
Rr 190.70		F- ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	632pb	Regnery et al., 1991
Rr 190.701		R- GTTCCGTTAATGGCAGCATCT		
cap	<i>Coxiella</i>			
CAP1-844F		F- ATTTAGTGGGTTTCGCGCAT	601pb	Reeves et al., 2006
CAP1-844R		R- CATCAGCATACGTTTCGGGAA		

* Riquétsias do Grupo da Febre Maculosa

FA – fragmento amplificado

Os produtos de PCR, no tamanho esperado para cada ensaio, foram purificados com ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), e sequenciados em sequenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) de acordo com as instruções do fabricante utilizando os mesmos *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados para PCR.

As sequências parciais obtidas foram submetidas à análise pelo programa Blast (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 9.0, com nível de significância = 0,05 (5%). Para comparação entre os grupos, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fischer quando necessário.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Mato Grosso

Foram coletadas amostras de tecidos (pulmões, baço e sangue total) e carrapatos de 49 animais silvestres, obtidos através da caça indígena Tapirapé no município de Confresa e encontrados atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT, no estado do Mato Grosso, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Espécies de animais silvestres obtidos através de caça indígena e atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT amostrados no período de setembro de 2010 a junho de 2012

(continua)

Espécie	Nome popular	N	Tecido^b
Mamíferos			
<i>Akodon</i> sp.	Roedor-silvestre	1	P/B
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	P/B
<i>Cavia</i> sp.	Preá	3	P/B
<i>Cerdocyon thous</i> ^a	Cachorro-do-mato	2	P/B
<i>Chiropotes</i> sp.	Cuxiú-preto	3	P/B
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	1	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	2	P
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasypus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	2	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	2	P/B
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu-peba	2	P/B
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	1	P/B

(conclusão)

Espécie	Nome popular	N	Tecido^b
<i>Micoureus demerarae</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis</i> sp.	Marsupial	1	P/B
<i>Nasua nasua</i> ^a	Quati	1	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	1	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	2	P/B
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Tapiti	3	P/B
<i>Tamandua tetradactyla</i> ^a	Tamanduá-mirim	2	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	2	P/B
Aves			
<i>Ardea cocoi</i>	Garça-moura	1	P
<i>Crax fasciolata</i>	Mutum-de-penacho	3	P
<i>Megascops choliba</i>	Coruja-do-mato	1	P
<i>Pauxi tuberosa</i>	Mutum-cavalo	1	P
<i>Penelope superciliaris</i>	Jacupemba	2	P
Répteis			
<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaretinga	3	P/F
<i>Kinosternon scorpioides</i>	Tartaruga	2	ST
Total		49	

^aAnimais encontrados atropelados na BR-158^bP- pulmões, B- baço, ST- sangue total e F - fígado

N - número de animais

Todas as amostras de tecidos foram negativas quanto à presença de DNA de *Rickettsia* e *Coxiella*.

Dos 49 animais silvestres amostrados, 14 (28,6%) estavam infestados e destes foram coletados 247 carrapatos, sendo 20 (8,1%) larvas, 173 (70%) ninfas e 54 (21,9%) adultos [29 (53,7%) machos e 25 (46,3%) fêmeas]. Do gênero *Amblyomma* foram coletados 246 exemplares, sendo identificadas 10 espécies: *A. auricularium* (1 espécime), *A. cajennense* (196), *A. coelebs* (1), *A. humerale* (11), *A. naponense* (20), *A. nodosum* (1), *A. oblongoguttatum* (12), *A. ovale* (1), *A. pacaie* (1) e *A. rotundatum* (2). Em adição, apenas um espécime da espécie *Haemaphysalis juxtakochi* foi coletado (Tabela 2). Foram depositados 11 espécimes na Coleção Nacional de Carrapatos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)

da Universidade de São Paulo (USP), sob o tombo 1728 e mais três lotes serão depositados (4 espécimes).

Tabela 2 - Espécies de carrapatos coletados em animais silvestres obtidos através de caça indígena e atropelados na rodovia BR-158, entre Marabá-PA e Confresa-MT, no período de setembro de 2010 a junho de 2012

Espécie	Hospedeiro		Carrapatos ^a												Nº colet.	Nº test. (%)	
	Nº anim.	Nº infest. (%)	A. aur	A. caj	A. coe	A. hum	A. nap	A. nod	A. obl	A. ova	A. pac	A. rot	H. Jux				
Mamíferos																	
<i>Cerdocyon thous</i>	2	1(50)		4N												4	4 (100)
<i>Cuniculus paca</i>	2	1 (50)						5N				1F				6	6 (100)
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	1 (100)		4N										1N		5	5 (100)
<i>Dasypus novemcinctus</i>	1	1 (100)	1M													1	1 (100)
<i>Nasua nasua</i>	1	1 (100)		1N, 7L ^b	1N											9	9 (100)
<i>Pecari tajacu</i>	1	1 (100)		2M, 1F, 74N				2M, 2F								81	81 (100)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	2	1(50)							1M							1	0 (0)
<i>Tayassu pecari</i>	2	2 (100)		3M, 6F, 1N				5M, 5F		4M, 8F						32	32 (100)
Aves																	
<i>Crax fasciolata</i>	2	1(50)		33N												33	33 (100)
<i>Pauxi tuberosa</i>	1	1 (100)		47N, 1L, 10L ^{b, c}				1N			1L ^b					60	59 (98.3)
<i>Penelope superciliaris</i>	2	1(50)		1N, 1L ^b												2	2 (100)
Répteis																	
<i>Chelonoidis denticulata</i>	1	1 (100)					11M									11	0 (0)
<i>Kinosternon scorpioides</i>	2	1 (50)											2F			2	0 (0)
Total	20	14 (70)	1	196	1	11	20	1	12	1	1	2	1			247	232 (93.9)

^a A. aur – *Amblyomma auricularium*, A. caj – *A. cajennense*, A. coe – *A. coelebs*, A. hum – *A. humerale*, A. nap – *A. naponense*, A. nod – *A. nodosum*, A. obl – *A. oblongoguttatum*, A. ova – *A. ovale*, A. pac – *A. pacae*, A. rot – *A. rotundatum* e H. jux – *Haemaphysalis juxtakochi*

^b Carrapatos identificados por análises moleculares a partir do fragmento do gene 16S rDNA (MANGOLD, et al., 1998)

^c Larvas testadas em pool (10 larvas de 243 *Amblyomma* sp.)

L – larva, N – ninfa, M – macho adulto e F – fêmea adulta

Nº anim. – número de animais (somente espécies que estavam infestadas)

Nº infest. – número de animais infestados por espécie

Nº colet. – número de carrapatos coletados por espécie

Nº test. – número de carrapatos testados pela PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)

Dos 247 carrapatos coletados, 232 (93,9%) foram testados quanto à presença de DNA de *Rickettsia* e *Coxiella*. Todas as amostras foram negativas para *Coxiella* e 139 (59,9%) foram positivas para o fragmento do gene *gltA* (primers CS-78 e CS-323) de *Rickettsia*. Na PCR para o fragmento do gene *ompA* (primers Rr190.70 e Rr190.701) 127 (91,4%) carrapatos foram positivos e destes uma parte de cada hospedeiro foi sequenciada. Para melhor caracterização de uma das amostras testadas, foram utilizados mais dois pares de *primers* para amplificação de fragmentos dos genes *gltA* (primers CS239-CS1069) e *htrA* (primers 17K3-17K5). Os resultados dos sequenciamentos estão expostos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA) de bactérias do gênero *Rickettsia* em carrapatos do gênero *Amblyomma* e *Haemaphysalis* coletados de animais silvestres da floresta Amazônica do município de Confresa, estado de Mato Grosso (MT), Brasil

(continua)

Carrapatos				Infecção por <i>Rickettsia</i>			
Espécies	Estágio	Nº	Hospedeiro	Nº pos. (%)	CSGB ^a		
					<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>htrA</i>
Mamíferos							
<i>A. cajennense</i>	ninfa	4	<i>C. thous</i>	3 (75)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. naponense</i>	ninfa	5	<i>C. paca</i>	1 (20)	97% <i>R. monteiroi</i> (FJ269035)	*	93% <i>R. monteiroi</i> (FJ269036)
<i>A. paca</i>	adulto	1	<i>C. paca</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	4	<i>D. azarae</i>	1(25)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>H. juxtakochi</i>	ninfa	1	<i>D. azarae</i>	1 (100)	NS	99% <i>R. rhipicephali</i> (CP003342)	*
<i>A. auricularium</i>	adulto	1	<i>D. novemcinctus</i>	1 (100)	99% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	NS	*
<i>A. cajennense</i>	larva ^c	7	<i>N. nasua</i>	6 (85.7)	100% <i>R. amblyommii</i> (JX867425)	NS	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	1	<i>N. nasua</i>	1 (100)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. coelebs</i>	ninfa	1	<i>N. nasua</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	74	<i>P. tajacu</i>	46 (62.2)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
				5 (6.7)	100% <i>R. amblyommii</i> (JX867425)	NS	*
<i>A. cajennense</i>	adulto	3	<i>P. tajacu</i>	0	*	*	*
<i>A. naponense</i>	adulto	4	<i>P. tajacu</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	1	<i>T. pecari</i>	1 (100)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. cajennense</i>	adulto	9	<i>T. pecari</i>	3 (33.3)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. naponense</i>	adulto	10	<i>T. pecari</i>	0	*	*	*
<i>A. oblongoguttatum</i>	adulto	12	<i>T. pecari</i>	0	*	*	*

(conclusão)

Carrapatos				Infecção por <i>Rickettsia</i>			
Espécies	Estágio	Nº	Hospedeiro	Nº pos. (%)	CSGB ^a		
					<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>htrA</i>
Aves							
<i>A. cajennense</i>	ninfa	33	<i>C. fasciolata</i>	30 (90.9)	NS	99% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. cajennense</i>	larva ^c	10 ^b	<i>P. tuberosa</i>	1/10 (10)	99% <i>R. amblyommii</i> (JX867425)	NS	*
<i>A. cajennense</i>	larva ^c	1	<i>P. tuberosa</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	47	<i>P. tuberosa</i>	39 (83)	NS	100% <i>R. amblyommii</i> (CP003334)	*
<i>A. ovale</i>	larva ^c	1	<i>P. tuberosa</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	larva ^c	1	<i>P. superciliaris</i>	0	*	*	*
<i>A. cajennense</i>	ninfa	1	<i>P. superciliaris</i>	0	*	*	*
Total		232		139 (59.9)			

Nº – número de carrapatos

Nº pos. – número de carrapatos positivos.

^aCSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

^bLarvas testadas em *pool* (10 larvas de 243 *Amblyomma* sp.)

^cCarrapatos identificados por análises moleculares a partir do fragmento do gene 16S rDNA (MANGOLD, et al., 1998)

4.3.2 Pará

Amostras de tecidos (pulmões e baço) e carrapatos foram coletadas de 132 animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217), de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Espécies de mamíferos silvestres atropelados entre os Km 50 e 217 da BR 163, entre os municípios de Santarém e Rurópolis, amostrados no período de fevereiro de 2009 a novembro de 2011

Espécie	Nome popular	N	Tecido^a
<i>Alouatta nigerrima</i>	Bugio-preto	11	P/B
<i>Bradypus variegatus</i>	Preguiça-comum	1	ST
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	P/B
<i>Callicebus moloch</i>	Zogue-zogue	1	P/B
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	1	ST
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	6	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	33	P/B
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	30	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	17	P/B
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	2	P/B
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Cuíca	2	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	2	P/B
<i>Proechimys</i> sp.	Roedor silvestre	5	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	1	P/B
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	8	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	9	P/B
	Total	132	

^aP- pulmões; B- baço; ST- sangue total

N – número de animais

Todas as amostras de tecidos foram negativas quanto à presença de DNA de *Rickettsia* e *Coxiella*.

Dos 132 mamíferos silvestres amostrados, 38 (28,8%) estavam infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma* (Tabela 5). Destes foram coletados 207 carrapatos e identificadas 10 espécies: *A. calcaratum* (9 espécimes), *A. coelebs* (2), *A. geayi* (2), *A. goeldii* (18), *A. humerale* (37), *A. longirostre* (10), *A. naponense* (91),

A. nodosum (30), *A. oblongoguttatum* (6) e *A. pacaе* (2), sendo 2 (0,1%) larvas, 53 (25,6%) ninfas e 152 (73,4%) adultos (98 [64,5%] machos e 54 [35,5%] fêmeas). Foram depositados 90 espécimes na Coleção Nacional de Carrapatos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sob nº 1446, 1447, 1457, 1500, 1505, 1506, 1507, 1811, 2098 e 2248.

Tabela 5 - Espécies de carrapatos coletados em mamíferos silvestres atropelados, entre os Km 50 e 217 da BR 163, entre os municípios de Santarém e Rurópolis, no período de fevereiro de 2009 a novembro de 2011

Hospedeiro			Carrapatos ^a										Nº colet.	No. test. (%)
Espécie	Nº anim.	No. infest. (%)	A. cal	A. coe	A. gea	A. goe	A. hum	A. lon	A. nap	A. nod	A. obl	A. pac		
<i>Alouatta nigerrima</i>	11	1 (9)			1L ^b								1	1 (100)
<i>Coendou prehensilis</i>	6	4 (66,7)						10M					10	10 (100)
<i>Cuniculus paca</i>	33	5 (15,1)		1N					9N				10	7 (70)
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	30	9 (30)					28N						28	2 (7,1)
<i>Didelphis marsupialis</i>	17	2 (11,8)			1L ^b		7N					2N	10	8 (80)
<i>Pecari tajacu</i>	2	1 (50)							1M, 2F				3	0 (0)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	8	7 (87,5)	8M, 1F			12M, 6F	2N			22M, 8F			59	3 (5,1)
<i>Tayassu pecari</i>	9	9 (100)		1N					43M, 33F, 3N		2M, 4F		86	86 (100)
Total	116	38 (32,7)	9	2	2	18	37	10	91	30	6	2	207	117 (56,5)

^a A. cal – *Amblyomma calcaratum*, A. coe – *A. coelebs*, A. gea – *A. geayi*, A. goe – *A. goeldii*, A. hum – *humerales*, A. lon – *A. longirostre*, A. nap – *A. naponense*, A. nod – *A. nodosum*, A. obl – *A. oblongoguttatum*, A. pac – *A. paca*

^b Carrapatos identificados por análises moleculares a partir do fragmento do gene 16S rDNA (MANGOLD, et al., 1998)

L – larva, N – ninfa, M – macho adulto e F – fêmea adulta

Nº anim. – número de animais (somente espécies que estavam infestadas)

Nº infest. – número de animais infestados por espécie

Nº colet. – número de carrapatos coletados por espécie

Nº test. – número de carrapatos testados pela PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)

Dos 207 carrapatos coletados, 117 (56,5%) foram testados quanto à presença de DNA de *Rickettsia* e *Coxiella*. Todas as amostras foram negativas para *Coxiella* e 27 (23,1%) foram positivas para o gene *gltA* (primers CS78-CS323) de *Rickettsia*. Na PCR para o gene *ompA* (primers Rr190.70-Rr190.701), 15 (55,5%) carrapatos foram positivos e destes uma parte dos carrapatos de cada hospedeiro foi sequenciada. Os resultados dos sequenciamentos estão expostos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA) de bactérias do gênero *Rickettsia* em carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados de mamíferos silvestres da floresta Amazônica dos municípios de Santarém, Estado do Pará (PA), Brasil

Carrapato				Infecção por <i>Rickettsia</i>		
Espécie	Estágio	Nº	Hospedeiro	Nº pos. (%)	CSGB ^a	
					<i>gltA</i>	<i>ompA</i>
<i>A. geayi</i>	larva ^b	1	<i>Alouatta nigerrima</i>	0	*	*
<i>A. longirostre</i>	adulto	10	<i>Coendou prehensilis</i>	6 (60)	NS	99% <i>R. amblyommii</i> (JX867426)
				1 (10)	100% <i>R. amblyommii</i> (JX867425)	NS
<i>A. coelebs</i>	Ninfa	1	<i>Cunuculus paca</i>	0	*	*
<i>A. naponense</i>	Ninfa	6	<i>Cunuculus paca</i>	0	*	*
<i>A. humerale</i>	Ninfa	2	<i>Dasypus novemcinctus</i>	1 (50)	NS	99% <i>R. amblyommii</i> (EF689731)
				1 (50)	100% <i>R. bellii</i> (JQ906786)	*
<i>A. geayi</i>	larva ^b	1	<i>Didelphis marsupialis</i>	0	*	*
<i>A. humerale</i>	Ninfa	7	<i>Didelphis marsupialis</i>	1(14.3)	NS	99% <i>R. amblyommii</i> (EF689731)
				1(14.3)	100% <i>R. bellii</i> (JQ906786)	*
				1(14.3)	100% <i>R. felis</i> (JN375498)	NS
<i>A. nodosum</i>	adulto	3	<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	*	*
<i>A. coelebs</i>	Ninfa	1	<i>Tayassu pecari</i>	0	*	*
<i>A. naponense</i>	Ninfa	3	<i>Tayassu pecari</i>	1 (33.3)	100% <i>R. bellii</i> (JQ906786)	*
<i>A. naponense</i>	adulto	76	<i>Tayassu pecari</i>	7 (9.2)	NS	99% <i>Rickettsia c. f. africae</i> (GU247115)
				6 (7.9)	100% <i>R. bellii</i> (JQ906786)	*
				1 (1.3)	100% <i>Rickettsia c. f. africae</i> (HQ335126)	NS
<i>A. oblongoguttatum</i>	adulto	6	<i>Tayassu pecari</i>	0	*	*
Total		117		27 (23.1)		

Nº – número de carrapatos

Nº pos. – número de carrapatos positivos.

^aCSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

^bLarvas testadas em *pool* (10 larvas de 243 *Amblyomma* sp.)

^cCarrapatos identificados por análises moleculares a partir do fragmento do gene 16S rDNA (MANGOLD, et al., 1998)

4.3.3 Análise Estatística

Houve associação da positividade na PCR para *Rickettsia* com o local ($p < 0,001$), uma vez que a proporção de positivos no estado do Pará (23,08%) é significativamente menor que no Mato Grosso (62,33%). Para análise estatística, considerou-se o *pool* de 10 larvas do Mato Grosso como um único indivíduo.

Analisando todos os carrapatos de ambos estados, houve associação da positividade com o gênero (considerando machos e fêmeas adultos) ($p = 0,023$), uma vez que a proporção de machos positivos (10%) é significativamente menor que a de fêmeas positivas (25,33%).

Quando analisados os estágios de vida dos carrapatos dos dois estados, houve diminuição significativa da positividade dos estágios imaturos para os adultos ($p < 0,001$).

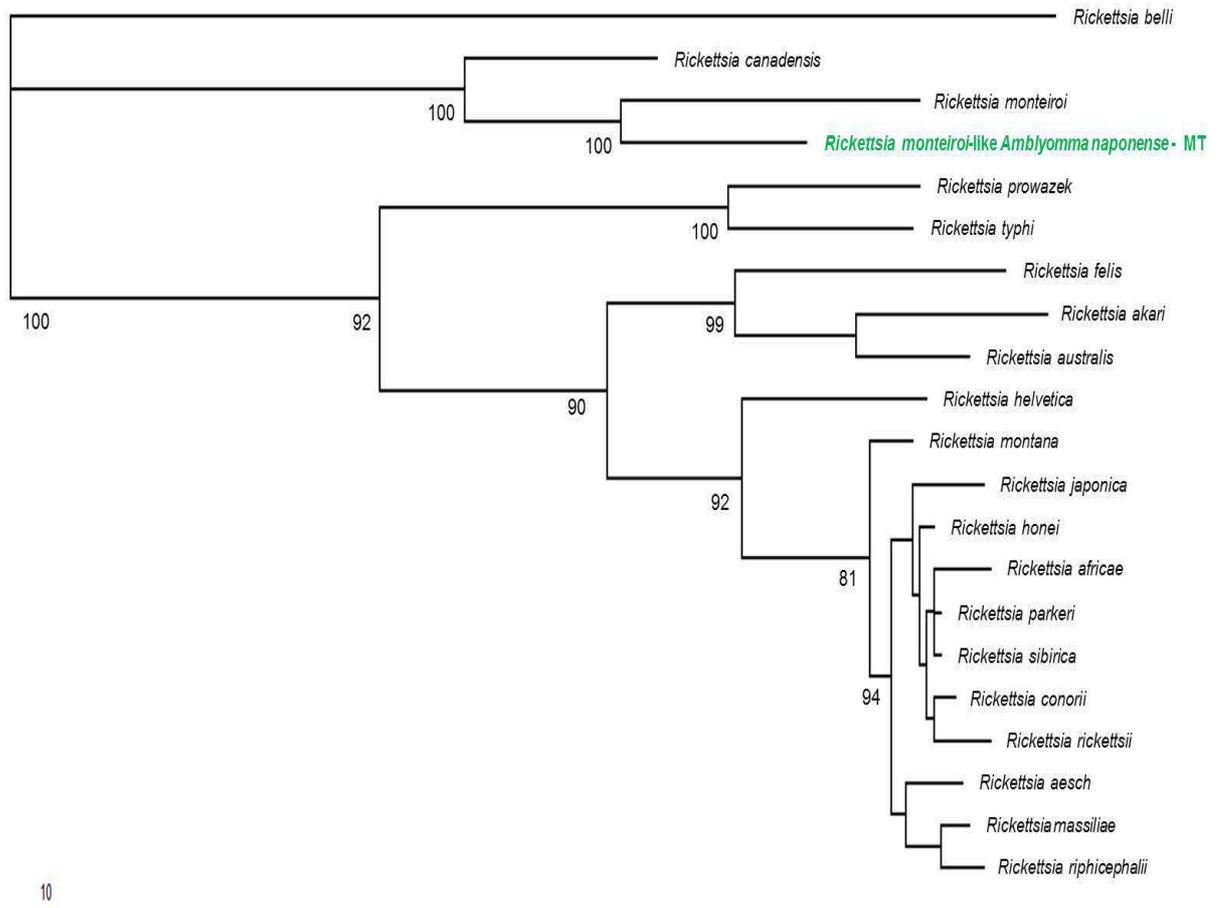
Em cada estado isoladamente, a associação da positividade com o gênero não foi significativa (considerando somente machos e fêmeas adultas) ($p = 0,294$), uma vez que a proporção de machos positivos (17,65%) é igual à de fêmeas positivas (4,35%), no Mato Grosso, e de machos positivos (27,59%) é igual à de fêmeas positivas (13,51%), no Pará.

No estado do Mato Grosso, houve uma tendência significativa de diminuição da positividade dos estágios imaturos para os adultos ($p < 0,001$). No estado do Pará, não houve diferença significativa da positividade entre os estágios ($p = 0,551$).

4.3.4 Análises Filogenéticas

Abaixo seguem as árvores filogenéticas geradas a partir das análises das sequências gênicas:

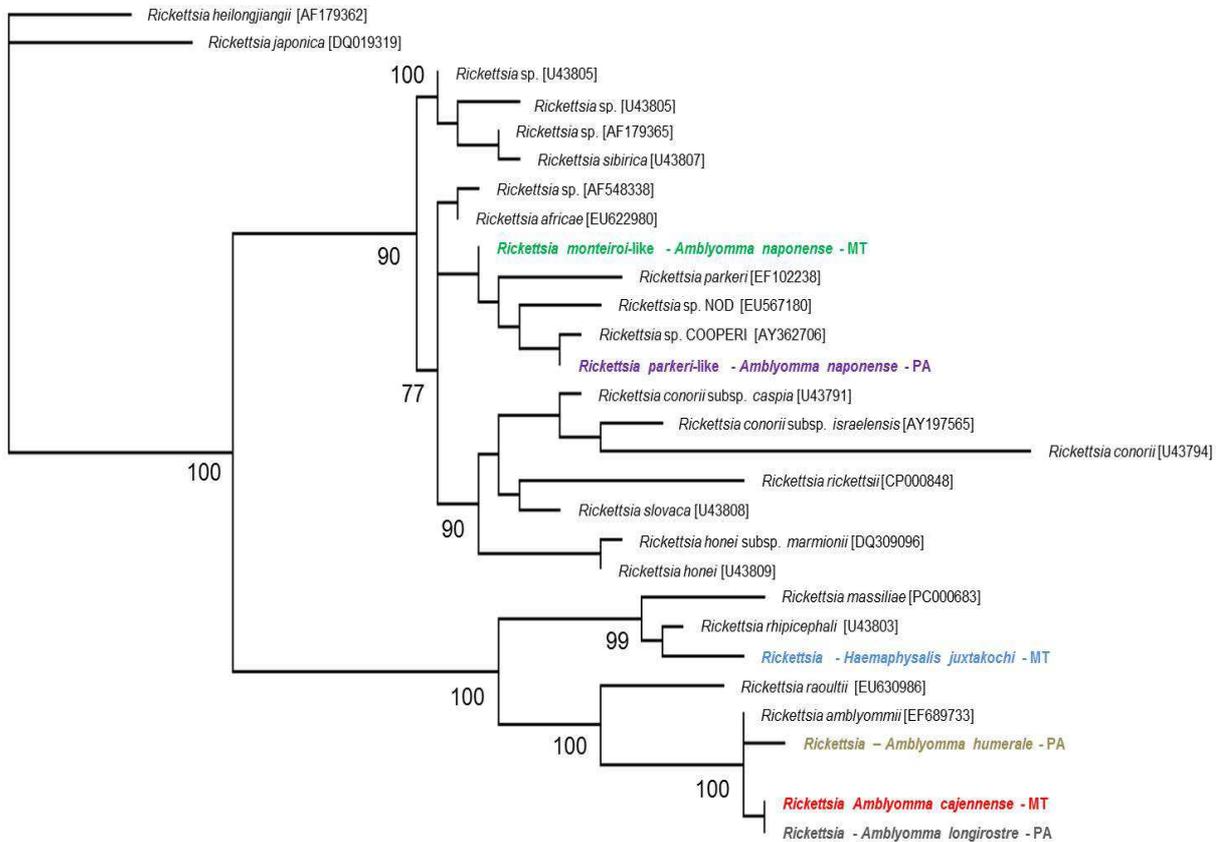
Figura 5 - Árvore filogenética das espécies *Rickettsia* baseada nas sequências parciais no gene *gltA* pelo método de máxima parcimônia (MP)



Árvore filogenética baseada no gene *gltA* pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 21 sequências de *Rickettsia*. Como grupo externo *Rickettsia bellii* (1477 caracteres, 264 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas.

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, outubro, 2013.

Figura 6 - Árvore filogenética das espécies *Rickettsia* baseada nas sequências parciais no gene *ompA* pelo método de máxima parcimônia (MP)



1

Árvore filogenética baseada no gene *ompA* pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 29 sequências de *Rickettsia*. Como grupo externo *Rickettsia japonica* e *Rickettsia heilongjiangii* (467 caracteres, 64 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas.

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, outubro, 2013.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Ocorrência de carrapatos

Mesmo com a grande quantidade de carrapatos coletados não foi possível quantificar e classificar corretamente o grau de infestação dos animais, pois não houve padronização na metodologia durante as coletas. No estado do Mato Grosso, mesmo com menor número de animais silvestres amostrados em relação ao Pará, foi obtido proporcionalmente maior número de carrapatos. Este fato pode ser explicado porque a caça chegava fresca (animais ainda quentes) e isso diminuiu muito o desprendimento natural de carrapatos. Já no estado do Pará, apesar do maior número de animais obtidos, estes ficavam muitas horas expostos às intempéries climáticas e atropelamentos repetitivos, o que diminuía ou até mesmo impossibilitava a coleta desses ectoparasitas. Almeida (2013), também relatou o baixo parasitismo por carrapatos em cachorros-do-mato (*C. thous*) atropelados em rodovia no estado do Espírito Santo (ES).

No estado do Mato Grosso (MT), foram coletados carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. naponense* parasitando catetos (*Pecari tajacu*) e *A. cajennense*, *A. naponense* e *A. oblongoguttatum* em queixadas (*Tayassu pecari*). No estado do Pará (PA) somente *A. naponense* foi encontrado em catetos, e em queixadas *A. naponense*, *A. oblongoguttatum* e *A. coelebs*. Carrapatos da espécie *A. naponense* já foram relatados parasitando *P. tajacu* no Brasil e no Peru, nos estágios de ninfa (MARTINS et al., 2011) e adulto (LABRUNA et al., 2005), e *T. pecari*, nas fases de ninfas e adultos (LABRUNA et al., 2010; MARTINS et al., 2011). As espécies *A. coelebs* e *A. oblongoguttatum* foram encontrados parasitando queixadas no Peru nos estágios de ninfa e adulto, respectivamente (LABRUNA et al., 2010).

Em tatus galinha (*D. novemcinctus*) foram coletadas ninfas de *A. humerale* no Pará, sendo este o primeiro relato de ninfas desta espécie parasitando esta espécie de hospedeiro. Existem somente relatos de parasitismo por adultos de *A. humerale* em tatus na Guiana Francesa (FLOCH; ABONNENC, 1940; FLOCH; FAURAN, 1958). No Mato Grosso, adulto da espécie *A. auricularium* foi encontrado parasitando *D. novemcinctus*. No Brasil, o parasitismo por carrapatos adultos *A.*

auricularium em tatu galinha já foi previamente relatado no bioma Cerrado do estado de Goiás (SZABÓ et al., 2007) e em tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*) em Pernambuco (SARAIVA et al., 2013).

Em pacas (*C. paca*) do Pará, foram encontradas ninfas de *A. coelebs* e *A. naponense*, e no Mato Grosso ninfas de *A. naponense* e adulto de *A. pacae*. O parasitismo por ninfas destas espécies de carrapatos é relatado pela primeira vez em *C. paca*. Carrapatos adultos de *A. naponense* e *A. coelebs* já foram relatados parasitando *Agouti paca* (= *C. paca*) na Venezuela e no Brasil, por Jones et al. (1972) e Labruna et al. (2005), respectivamente. Adultos de *A. pacae* também foram encontrados por Labruna et al. (2005) parasitando *A. paca*.

No Pará, em gambás (*D. marsupialis*) foram coletadas ninfas de *A. humerale*, *A. pacae* e larva de *A. geayi*. Carrapatos das espécies *A. humerale* e *A. pacae* foram também encontrados parasitando *D. marsupialis* em Rondônia (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2005). Este é o primeiro relato de *A. geayi* parasitando esta espécie de marsupial no Brasil.

Os carrapatos *A. calcaratum*, *A. goeldii*, *A. humerale* e *A. nodosum* foram encontrados em tamanduás-mirim (*T. tetradactyla*) no Pará. No Brasil, *A. calcaratum* e *A. nodosum* também foram relatadas em tamanduá mirim no estado de Rondônia (LABRUNA et al., 2005) e *A. goeldii* foi relatado na Guiana Francesa (FLOCH; FAURAN, 1958). Este é o primeiro relato de ninfas de *A. humerale* em *T. tetradactyla*.

Em ouriço-cacheiro (*C. prehensilis*) carrapatos adultos da espécie *Amblyomma longirostre* foram coletados no Pará, corroborando com o trabalho de Labruna et al. (2009).

São relatadas pela primeira vez o parasitismo por larva de *A. geayi* em bugio-preto (*A. nigerrima*) do Pará, ninfa de *A. coelebs* em quati (*N. nasua*), larva de *Amblyomma ovale* e ninfa de *A. naponense* em mutum-cavalo (*P. tuberosa*) do Mato Grosso. Em aves, *A. naponense* foi relatado em choca-do-planalto (*Thamnophilus pelzenii*) na Mata Atlântica do estado de São Paulo (OGRZEWALSKA et al., 2009).

Machos de *A. humerale* foram coletados em jabuti (*C. denticulata*), no Mato Grosso. Labruna et al. (2002) também encontraram carrapatos adultos da mesma espécie parasitando jabutis em Rondônia. Ainda no Mato Grosso, foram encontradas fêmeas de *A. rotundatum* em cágado (*Kinosternon scorpioides*). Carrapatos *A.*

rotundatum já foram relatados nesta espécie de réptil no Brasil por Amorim et al. (1998).

O parasitismo por ninfas de *H. juxtakochi* em *D. agouti* e *D. fuliginosa* foi relatado por Jones et al. (1972) na Venezuela, corroborando os dados do presente trabalho que encontrou a mesma espécie de carrapato em *D. azarae* no estado do Mato Grosso.

4.4.2 Infecção por *Rickettsia* em tecidos

Nenhuma das amostras de tecidos de animais silvestres testadas foi positiva para *Rickettsia*, em ambos estados, mesmo com a presença de carrapatos infectados nos animais amostrados. A detecção de *Rickettsia* em tecidos de vertebrados é um acontecimento pouco frequente, pois uma vez infectados podem apresentar ricketsemia, só por alguns dias ou semanas, e depois disso a bactéria não é mais encontrada no vertebrado (BURGDORFER et al., 1989).

4.4.3 Infecção por *Rickettsia* em carrapatos

No presente estudo, *R. amblyommii* foi detectada em carrapatos da espécie *A. cajennense* e *A. auricularium* no estado do Mato Grosso e, *A. longirostre* e *A. humerale* no estado do Pará. No Brasil, a infecção por *R. amblyommii* já foi descrita nas espécies *A. cajennense* em Rondônia (LABRUNA et al., 2004); *A. auricularium* em Pernambuco (SARAIVA et al., 2013); *A. longirostre* nos estados da Bahia (OGRZEWALSKA et al., 2011), Pará (OGRZEWALSKA et al., 2010), Rondônia (LABRUNA et al., 2004) e São Paulo (OGRZEWALSKA et al., 2008). Não há relatos da infecção por *R. amblyommii* em *A. humerale*.

No estado do Mato Grosso, *R. rhipicephali* foi detectada em *H. juxtacochi*. A infecção por esta riquetsia já foi relatada em carrapatos da mesma espécie nos estados de Rondônia e São Paulo (LABRUNA et al., 2005; LABRUNA et al., 2007a,b).

Uma nova riquetsia geneticamente próxima de *R. monteiroi*, nomeada de *Rickettsia monteiroi-like*, foi encontrada em *A. naponense* no Mato Grosso. Esse é o primeiro relato de infecção por *Rickettsia* em *A. naponense* no Brasil. *Rickettsia monteiroi* foi recentemente isolada e descrita, pela primeira vez, infectando carrapatos da espécie *Amblyomma incisum*, no estado de São Paulo (PACHECO et al., 2011).

No Pará, *A. humerale* e *A. naponense* apresentaram infecção por *R. bellii*. Em Rondônia, *R. bellii* já foi descrita infectando *A. humerale* e outras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2004). Na literatura não há relatos da infecção por *Rickettsia* em *A. naponense*, sendo este também o primeiro registro de *R. bellii* nessa espécie de carrapato.

Ainda no estado do Pará, em *A. naponense*, foi detectada outra espécie de riquetsia semelhante à *Rickettsia parkeri*, nomeada *Rickettsia c.f. africae*, infectando carrapatos adultos dessa espécie.

Rickettsia felis foi detectada em ninfa de *A. humerale* no estado do Pará. Não há dados na literatura quanto a infecção de *A. humerale* por *R. felis*.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra o grande potencial, ainda pouco explorado, para pesquisas de patógenos em carrapatos de animais silvestres, em especial da fauna Amazônica, sendo necessários maiores estudos para se conhecer o ciclo da *Rickettsia* na natureza em áreas ainda pouco influenciadas pela ação do homem. São relatados, pela primeira vez, novos hospedeiros invertebrados para bactérias do gênero *Rickettsia* e patógenos associados a carrapatos, bem como novas relações entre parasitas e hospedeiros nunca antes descritos no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S.; PERALTA, A. S. L.; TEIXEIRA, R. H. F.; SERRA-FREIRE, N. M. Ixodofauna de quelônio do Brasil. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, Seropédica/RJ, v. 20, n. 1-2, p. 31-35, 1998.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.). **Biology of rickettsial diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v. 1, p. 34-47.
- DYKOVÁ, I.; VEVERKOVÁ, M.; FIALA, I.; MACHÁCKOVÁ, B.; PECKOVÁ, H. *Nuclearia pattersoni* sp n. (Filosea), a new species of amphizoic amoeba isolated from gills of roach (*Rutilus rutilus*), and its rickettsial endosymbiont. **Folia Parasitologica**, v. 50, p. 161–170, 2003.
- ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685–715, 1999.
- FLOCH, H.; ABONNENC, E. Ixodides de la Guyane Francaise. **Publication Institute Pasteur Guy Ter l'Inini (Cayenne)**, v. 4, p. 1-31, 1940.
- FLOCH, H.; FAURAN, P. Ixodidés de la Guyane et dès Antilles Francaises. **Archives de l'Institut Pasteur de la Guyane Francaise** (Publication 446), v. 19, p. 1-94, 1958.
- JONES E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRAN, S. J. E.; KOHLS, G. M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. **Brigham Young University Science Bulletin**, v. 17, p. 1-40, 1972.
- LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

- LABRUNA, M. B.; ROMERO, M.; MARTINS, T. F.; TOBLER, M.; FERREIRA, F. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari:Ixodidae) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and peccaries (*Tayassu pecari*) in Peru. **Systematic Applied Acarology**, v. 15, p. 109-112, 2010.
- LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; TERRASSINI, F. A.; SCHUMAKER, T. T.; CAMARGO, E. P. Notes on parasitism by *Amblyomma humerale* (Acari: Ixodidae) in the State of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 9, n. 6, p. 814-817, 2002.
- LABRUNA, M. B.; ONOFRIO, V. C.; BEATI, L.; ARZUA, M.; BERTOLA, P. B.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Redescription of the female, description of the male, and several new records of *Amblyomma parkeri* (Acari:Ixodidae), a South American tick species. **Experimental Applied Acarology**, v. 49, p. 243-260, 2009.
- LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. L.; CAMARGO, M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 1073-1081, 2004a.
- LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 90-98, 2004b.
- LIM, M.Y.; BRADY, H.; HAMBLING, T.; SEXTON, K.; TOMPKINS, D.; SLANEY, D. *Rickettsia felis* infections New Zealand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 167–169, 2012.
- MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, p. 478–484, 1998.
- MARTINS, T. F.; FURTADO, M. M.; JACOMO, A. T. A.; SILVEIRA, L.; SOLLMANN, R.; TORRES, N. M.; LABRUNA, M. B. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park, Goiás State, central Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 16, n. 3, p. 201-206, 2011.
- OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHEIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic

rain forest region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1225–1229, 2009.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia belli* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

PERLMAN, S. J.; HUNTER, M. S.; ZCHORI-FEIN, E. The emerging diversity of *Rickettsia*. **Proceedings Biological Science**, v. 273, p. 2097–2106, 2006.

REGNERY, R. L.; SPRUIL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portion of two Rickettsial gene. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1576-1589, 1991.

REEVES, W. K.; LOFITS, A. D.; SANDERS, F.; SPINKS, M. D.; WILLS, W.; DENISON, A. M.; DASCH, G. A. *Borrelia*, *Coxiella* and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus accidentalis*) rookery in South Carolina, USA. **Experimental & Applied Acarology**, v. 39, p. 321-329, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 73-84, 2007.

5 DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS EM ANIMAIS SILVESTRES DO BIOMA AMAZÔNIA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL

5.1 INTRODUÇÃO

A identificação de agentes infecciosos em animais selvagens é crucial, não só para a preservação da espécie, mas também fornece informações valiosas sobre o perfil epidemiológico na cadeia de transmissão de doenças (SILVEIRA et al., 2011).

Babesia, *Cytauxzoon* e *Theileria* são gêneros de protozoários da ordem Piroplasmida, conhecidos por infectar animais domésticos e silvestres, sendo transmitidos por carrapatos da família Ixodidae (RISTIC; KREIER, 1981; GREENE et al., 2006).

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, que parasitam grande número de hospedeiros vertebrados. Atualmente, existem mais de 340 espécies de *Hepatozoon* descritas em anfíbios, répteis, aves e mamíferos (SMITH, 1996; BANETH, 2011).

Devido à escassez de dados sobre doenças transmitidas por carrapatos entre animais do bioma Amazônia, o presente trabalho teve como objetivo relatar a detecção molecular de hemoparasitas (Piroplasmida e *Hepatozoon* spp.) em animais silvestres de vida livre do bioma Amazônia, dos estados do Mato Grosso e Pará, regiões centro-oeste e norte do Brasil.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Entre fevereiro de 2009 e junho de 2012, foram coletados tecidos de animais silvestres de diferentes espécies (mamíferos, aves e répteis) da Amazônia brasileira dos estados do Mato Grosso (MT) e Pará (PA).

No estado do Mato Grosso as amostras foram obtidas de animais silvestres caçados e utilizados como alimento pelos índios da etnia Tapirapé, na área da

reserva indígena no município de Confresa (10°38'57.0"S/ 51°34'12.6"W) na qual estão distribuídas sete aldeias: Urubu Branco (10°40'16.1"S/51°21'13.8"W), Sapeva (10°48'12.2"S/51°17'12.8"W), Córrego da Onça (10°42'27.5"S/51°18'49"W), Buriti II (10°39'33.6"S/51°17'41.2"W), Codebra (10°52'09.6"S/51°15'37.8"W), Xexéu (10°51'20.6"S/51°18'19.8"W) e Santa Laura (10°36'23.9"S/51°10'47.9"W). Durante a viagem, para a realização das coletas, foram coletados carrapatos e fragmentos de tecidos e de animais silvestres encontrados atropelados na rodovia BR-158, no trecho entre os municípios de Marabá-PA e Confresa-MT.

No estado do Pará, as amostras foram coletadas de animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217) entre os municípios de Santarém (2°24'52"S/54°42'36"W) e Rurópolis (4°05'44"S/ 54°54'37"W), onde está localizada a Floresta Nacional do Tapajós, que faz limite com o Rio Tapajós e com a rodovia BR 163 Santarém-Cuiabá.

Os fragmentos de órgãos internos, pulmões e baço, ou sangue foram coletados, armazenados em microtubos estéreis e mantidos a 20°C negativos até o processamento através de análises moleculares.

A extração de DNA dos órgãos foi realizada através de kit comercial (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme as instruções do fabricante. Para todas as extrações foram inclusos controles (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) para indicar contaminação entre amostras durante o procedimento. O DNA de cada amostra extraída foi quantificado em Espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-Vis, ThermoScientific, USA). Todas as amostras com quantidade acima de 20 ng/μL de DNA foram submetidas às análises moleculares pela PCR.

Todas as amostras de tecido e sangue foram testadas quanto à presença de DNA de protozoários da família Trypanosomatidae, ordem Piroplasmida e do gênero *Hepatozoon*. Em todas as reações foram utilizados controles negativo (água Milli-Q) e positivo (DNA de *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis*). As informações dos *primers* utilizados no presente estudo estão descritos no quadro 4.

Os produtos de PCR, no tamanho esperado para cada ensaio, foram purificados com ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e sequenciados em sequenciador automático (Applied Biosystems /PerkinElmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) de acordo com as instruções do

fabricante e utilizando os mesmos *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados para PCR. As sequências parciais obtidas foram submetidas à análise pelo programa Blast (ALTSCHUL et al. 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 9.0, com nível de significância = 0,05 (5%). Para comparação entre os grupos, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fischer quando necessário.

Quadro 4 - *Primers* utilizados na PCR no presente estudo

Gene / <i>Primers</i>	Agente	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	FA ^a	Referência
18S rRNA	Piroplasmida			
BAB2 143-167		F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551pb	Almeida et al., 2012
BAB2 694-667		R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		
18S rRNA	Hepatozoon			
HEP2 144-169		F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574pb	Almeida et al., 2012
HEP2 743-718		R- ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG		
18S SSU rRNA	Trypanosomatidae			
609		F- CACCCGCGGTAATTCCAGC	900pb	Maia da Silva et al., 2004
706		R- TTGAGGTTACAGTCTCAG		

^a Fragmento amplificado

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Mato Grosso

Foram coletadas amostras de tecidos (pulmões, baço e sangue total) de 49 animais silvestres, obtidos através da caça indígena Tapirapé no município de Confresa e encontrados atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT, no estado do Mato Grosso, conforme tabela 7.

Tabela 7 - Espécies de animais silvestres obtidos através de caça indígena e atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT amostrados no período de setembro de 2010 a junho de 2012

Espécie	Nome popular	N	Tecido^b
Mamíferos			
<i>Akodon</i> sp.	Roedor silvestre	1	P/B
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	P/B
<i>Cavia</i> sp.	Preá	3	P/B
<i>Cerdocyon thous</i> ^a	Cachorro-do-mato	2	P/B
<i>Chiropotes</i> sp.	Macaco cuxiú preto	3	P/B
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	1	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	2	P
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasyprocta novemcinctus</i>	Tatu-galinha	2	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	2	P/B
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu-peba	2	P/B
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado mateiro	1	P/B
<i>Micoureus demerarae</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis</i> sp.	Marsupial	1	P/B
<i>Nasua nasua</i> ^a	Quati	1	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	1	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	2	P/B
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Tapiti	3	P/B
<i>Tamandua tetradactyla</i> ^a	Tamanduá-mirim	2	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	2	P/B
Aves			
<i>Ardea cocoi</i>	Garça-moura	1	P
<i>Crax fasciolata</i>	Mutum-de-penacho	3	P
<i>Megascops choliba</i>	Coruja-do-mato	1	P
<i>Pauxi tuberosa</i>	Mutum-cavalo	1	P
<i>Penelope superciliaris</i>	Jacupemba	2	P
Répteis			
<i>Caiman crocodilos</i>	Jacaretinga	3	P/F
<i>Kinosternon scorpioides</i>	Tartaruga	2	ST
Total		49	

^a Animais encontrados atropelados na BR-158

^b P- pulmões; B- baço; ST- sangue total; F- fígado

N - número de animais

Todas as amostras de tecido e sangue foram negativos pela PCR para detecção de membros da família Trypanosomatidae. Na PCR para o fragmento de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon*, 5 (10,2%) animais foram positivos, sendo 3 (100%) amostras de pulmão de jacaretinga (*C. crocodilus*) e 2 (100%) de sangue total de tartaruga aquática (*K. scorpioides*). As sequências geradas a partir dos produtos amplificados foram editadas e analisadas pelo BLAST. As 3 sequências de jacaretinga (523pb, 511pb, 564pb) apresentaram 99% (517/521, 507/511, 552/559) de similaridade com *Hepatozoon ayorgbor* (EF157822) e 98% (512/520) com *Hepatozoon* sp. (FJ719817, FJ719819, FJ719818); as 2 amostras de tartaruga aquática (545pb) apresentaram 96% (522/545) se similaridade com *H. ayorgbor* (EF157822) e com outras múltiplas sequências 96% (523/545) *Hepatozoon* sp. (HM585210, FJ719813, AY600625).

Na PCR para o fragmento de 551 pb do gene 18S rRNA da ordem Piroplasmida 5 (10,2%) animais foram positivos em amostras de pulmão, 3 (100%) jacaretinga, também positivas para *Hepatozoon*, 1 (100%) de cutia (*D. azarae*) e 1 de tatu-galinha (*D. novemcinctus*). Os produtos amplificados foram sequenciados e analisados pelo BLAST. As 3 sequências de jacaretinga apresentaram similaridade de 99% com *H. ayorgbor* (HM585205), de cutia 96% com *Theileria velifera* (JN572704) e 96% (384/399) com *T. equi* (EU888903) na amostra de tatu-galinha (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA) de protozoários do gênero *Hepatozoon* e ordem Piroplasmida em tecidos coletados de animais silvestres da floresta Amazônica do município de Confresa, estado do Mato Grosso (MT), Brasil

(continua)

Espécie	Nº Examinados	Gene			
		18S <i>Hepatozoon</i>		18S Piroplasmida	
		Nº Pos. (%)	CSGB ^a	Nº Pos. (%)	CSGB ^a
Mamíferos					
<i>Akodon</i> sp.	1	0	*	0	*
<i>Cabassous unicinctus</i>	1	0	*	0	*
<i>Cavia</i> sp.	3	0	*	0	*
<i>Sapajus</i> sp.	2	0	*	0	*
<i>Cerdocyon thous</i> ^b	2	0	*	0	*
<i>Chiropotes</i> sp.	3	0	*	0	*
<i>Coendou prehensilis</i>	1	0	*	0	*
<i>Cuniculus paca</i>	2	0	*	0	*
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	0	*	1 (100)	96% <i>Theileria velifera</i> (JN572704)
<i>Dasypus novemcinctus</i>	2	0	*	1 (50)	96% <i>Theileria equi</i> (EU888903)
<i>Didelphis marsupialis</i>	2	0	*	0	*
<i>Euphractus sexcinctus</i>	2	0	*	0	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	1	0	*	0	*
<i>Mazama americana</i>	1	0	*	0	*
<i>Micoureus demerarae</i>	1	0	*	0	*
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	1	0	*	0	*
<i>Monodelphis</i> sp.	1	0	*	0	*
<i>Nasua nasua</i> ^b	1	0	*	0	*
<i>Pecari tajacu</i>	1	0	*	0	*
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	3	0	*	0	*

(conclusão)

Espécie	Nº Examinados	Gene			
		18S Hepatozoon		18S Piroplasmida	
		Nº Pos. (%)	CSGB ^a	Nº Pos. (%)	CSGB ^a
<i>Tamandua tetradactyla</i> ^b	2	0	*	0	*
<i>Tayassu pecari</i>	2	0	*	0	*
Aves					
<i>Ardea cocoi</i>	1	0	*	0	*
<i>Crax fasciolata</i>	3	0	*	0	*
<i>Megascops choliba</i>	1	0	*	0	*
<i>Pauxi tuberosa</i>	1	0	*	0	*
<i>Penelope superciliaris</i>	2	0	*	0	*
Répteis					
<i>Caiman crocodilus</i>	3	3 (100)	99 % <i>Hepatozoon ayorgbor</i> (HM585205)	3 (100)	99 % <i>Hepatozoon ayorgbor</i> (HM585205)
<i>Kinosternon scorpioides</i>	2	2 (100)	96 % <i>Hepatozoon ayorgbor</i> (EF157822)	0	*
Total	49	5 (10.2)		5 (10.2)	

^a CSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

^b Animais encontrados atropelados na BR-158

Nº Examinados – número de animais examinados

Nº Pos. – número de animais positivos

5.3.2 Pará

Amostras de tecidos (pulmões e baço) foram coletadas de 132 animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217), de acordo com a tabela 9.

Tabela 9 - Espécies de mamíferos silvestres atropelados entre os Km 50 e 217 da BR 163, entre os municípios de Santarém e Rurópolis, amostrados no período de fevereiro de 2009 a novembro de 2011

Espécie	Nome popular	N	Tecido^a
<i>Alouatta nigerrima</i>	Bugio-preto	11	P/B
<i>Bradypus variegatus</i>	Preguiça-comum	1	ST
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabomole	1	P/B
<i>Callicebus moloch</i>	Zogue-zogue	1	P/B
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	1	ST
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	6	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	33	P/B
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	30	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	17	P/B
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	2	P/B
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Cuíca	2	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	2	P/B
<i>Proechimys</i> sp.	Roedor silvestre	5	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	1	P/B
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	8	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	9	P/B
Total		132	

^a P- pulmões; B- baço; ST- sangue total

N - número de animais

Todas as amostras de tecido foram negativas pela PCR para Trypanosomatidae. Na PCR para o fragmento de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* 2 (1,5%) animais foram positivos, sendo 1 (100%) amostra de baço de jaguatirica (*L. pardalis*) e 1 (3%) de pulmão de paca (*C. paca*). As sequências geradas a partir dos produtos amplificadas foram editadas e analisadas pelo BLAST,

ambas apresentando similaridade com *Hepatozoon felis*, sendo 99% (471/474) (KF034779) em jaguatirica (474pb) e 95% (594/520) (GQ327216) em paca (553pb). Na PCR para o fragmento de 551 pb do gene 18S rRNA da ordem Piroplasmida 11 (8,3%) animais foram positivos em amostras de pulmão e baço, 4 (12,1%) de paca, 2 (6,7%) de tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), 1 (5,9%) de gambá (*D. marsupialis*), 1 jaguatirica (*Leopardus pardalis*), 2 veados (*M. americana*) e 1 (11,1%) queixada (*T. pecari*). Os produtos amplificados foram sequenciados e analisados pelo BLAST apresentando similaridade de 98% (1 amostra) e 95% (3 amostras) (391/399, 437/459) com *Babesia* sp. capivara (EF222255) nas amostras de paca (537pb, 499pb), 96% (387/402) com *T. equi* (EU888903) na amostra de tatu-galinha (487pb), 94% (470/502) com *Theileria bicornis* (AF499604) na amostra de gambá (524pb), 100% com *Cytauxzoon felis* (GU903911) na amostra de jaguatirica, 100% com *Theileria cervi* (AY735134) em veado-mateiro (534pb) e 95% com *Babesia duncani* (HQ289870) em queixada (514pb) (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA) de protozoários do gênero *Hepatozoon* e ordem Piroplasmida em tecidos coletados de animais silvestres da floresta Amazônica do município de Santarém, estado do Pará (PA), Brasil

Espécie	Nº Examinados	Gene			
		18S <i>Hepatozoon</i>		18S Piroplasmida	
		Nº Pos. (%)	CSGB ^a	Nº Pos. (%)	CSGB ^a
<i>Alouatta nigerrima</i>	11	0	*	0	*
<i>Bradypus tridactylus</i>	1	0	*	0	*
<i>Cabassous unicinctus</i>	1	0	*	0	*
<i>Callicebus moloch</i>	1	0	*	0	*
<i>Sapajus</i> sp.	1	0	*	0	*
<i>Choloepus didactylus</i>	1	0	*	0	*
<i>Coendou prehensilis</i>	6	0	*	0	*
<i>Cuniculus paca</i>	33	1 (3)	95% <i>Hepatozoon felis</i> (GQ377216)	4 (12,1)	95% <i>Babesia</i> sp. capivara (EF222255)
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	0	*	0	*
<i>Dasypus novemcinctus</i>	30	0	*	2 (6,7)	96% <i>Theileria equi</i> (EU888903)
<i>Didelphis marsupialis</i>	17	0	*	1 (5,9)	94% <i>Theileria bicornis</i> (AF499604)
<i>Leopardus pardalis</i>	1	1 (100)	100% <i>Hepatozoon felis</i> (KF034779)	1 (100)	100% <i>Cytauxzoon felis</i> (GU903911)
<i>Mazama americana</i>	2	0	*	2 (100)	100% <i>Theileria cervi</i> (AY735134)
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	2	0	*	0	*
<i>Pecari tajacu</i>	2	0	*	0	*
<i>Proechimys</i> sp.	5	0	*	0	*
<i>Tamandua tetradactyla</i>	8	0	*	0	*
<i>Tayassu pecari</i>	9	0	*	1 (11,1)	95% <i>Babesia duncani</i> (HQ289870)
Total	132	2 (1.5)		11 (8.3)	

^aCSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

Nº Examinados – número de animais examinados

Nº Pos. – número de animais positivos

5.3.3 Análise estatística

Para a ordem Piroplasmida não houve associação da positividade com o local ($p=0,769$), uma vez que a proporção de positivos no Mato Grosso (10,2%) é igual à proporção de positivos no Pará (8,33%).

Para o gênero *Hepatozoon* houve associação da positividade com o local ($p=0,016$), uma vez que a proporção de positivos no Mato Grosso (10,2%) é maior à proporção de positivos no Pará (1,51%).

5.4 DISCUSSÃO

No estado do Mato Grosso e do Pará, em amostras de tatú-galinha (*Dasyus novemcinctus*) foram detectados agentes da ordem Piroplasmida, e em ambos as sequencias obtidas apresentaram 96% de similaridade com *T. equi*. Não foram encontrados dados na literatura científica sobre infecção por piroplasmas em *D. novemcinctus*, sendo este o primeiro trabalho com esta espécie. Criado-Fornelio et al. (2009) relataram a infecção em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) cujas sequências foram 90% similares com *T. equi*.

Em amostra de cutia (*D. azarae*) do Mato Grosso, foi detectado um piroplasma similar (96%) a *Theileria velifera*, espécie que infecta ruminantes domésticos e silvestres na África (BISHOP et al., 2004; CHAISI et al., 2013). Até o presente, não foram encontrados dados sobre a infecção de *D. azarae* por agentes da ordem Piroplasmida, sendo relatado pela primeira vez na espécie.

Amostras de paca (*C. paca*) do Pará foram positivas e as sequências obtidas apresentaram similaridade (95%) com *Babesia* sp., descrita recentemente em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2009). Uma das amostras de *C. paca* também foi positiva para o gênero *Hepatozoon*, sendo a sequência similar (95%) a *Hepatozoon felis*. No Brasil, foi relatada a infecção por *Hepatozoon canis* em capivaras (*H. hydrochaeris*) no Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2009), contudo não há relatos da infecção por *H. felis* em *C. paca*, sendo este o primeiro.

Ainda no estado do Pará, uma amostra tecido de gambá-comum (*D. marsupialis*) foi positiva, sendo a sequência similar (94%) a *Theileria bicornis* que infecta rinoceronte-negro (*Diceros bicornis*) na África (NIJHOF et al., 2003).

Foram coletadas amostras de veado-mateiro (*M. americana*) do estado do Pará, as quais foram positivas e as sequências geradas apresentaram 100% de identidade com *Theileria cervi*. No Brasil, o primeiro trabalho a detectar *T. cervi* em cervídeos foi realizado em Minas Gerais nas espécies cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). No mesmo estudo, além de *T. cervi*, foram encontrados animais positivos para outros piroplasmas incluindo *Theileria* sp., *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (SILVEIRA et al., 2011).

Em jaguatirica (*Leopardus pardalis*), do estado do Pará, foram detectados *C. felis* e *H. felis*. No Brasil, a infecção por *C. felis* foi relatada em *L. pardalis* e em outras espécies de felídeos silvestres de cativeiro, no estado de São Paulo e em Brasília (ANDRÉ et al., 2009). A infecção por *Hepatozoon* em felídeos silvestres também já foi relatada no Brasil, nos estados do Ceará e Maranhão (METZGER et al., 2008), e São Paulo e Brasília (ANDRÉ et al., 2010).

No Pará, uma amostra de queixada (*T. pecari*) foi positiva e a sequência gerada apresentou similaridade de 95% com *Babesia duncani*, que foi relatada como um novo agente causador de babesiose em humanos, associada a transfusões sanguíneas (BLOCH et al., 2012)

Amostras de répteis das espécies jacaretinga (*C. crocodilus*) e tartaruga aquática (*K. scorpioides*) do estado do Mato Grosso foram positivas quanto à presença de DNA de *Hepatozoon*, apresentando similaridade de 96% e 99% com *Hepatozoon ayorgbor*. Pesquisas com detecção molecular de *Hepatozoon* em répteis no Brasil são muito escassas, os trabalhos existentes são limitados a caracterização morfológica e diagnóstico de infecção por esfregaço sanguíneo (MOÇO et al., 2002; LAINSON et al., 2003; LOPES et al., 2010). Este é o primeiro trabalho de detecção molecular de *Hepatozoon* nessas espécies no país.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, ainda existem muitas áreas para serem exploradas na pesquisa com animais silvestres, principalmente em relação a doenças. Pouco se sabe sobre os patógenos que esses animais albergam e se apresentam ou não patogenicidade para estes para os animais. Neste trabalho são relatados, pela primeira vez, agentes da ordem Piroplasmida e do gênero *Hepatozoon* infectando animais silvestres da fauna Amazônica dos estados do Mato Grosso e Pará.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 203–206, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H.; DAGNONE, A. S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 234–237, 2009.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 134–138, 2010.
- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 3–11, 2011.
- BISHOP, R.; MUSOKE, A.; MORZARIA, S.; GARDNER, M.; NENE, V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology**, v. 129, S271–S283, 2004.
- BLOCH, E. M.; HERWALDT, B. L.; LEIBY, D. A.; SHAIIB, A.; HERRON, R. M.; CHERVENAK, M.; REED, W.; HUNTER, R.; RYALS, R.; HAGAR, W.; XAYAVONG, M. V.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J.; WILKINS, P. P.; KJEMTRUP, A. M. The third described case of transfusion-transmitted *Babesia duncani*. **Transfusion**, v. 52, p. 1517-1522, 2012.
- CHAI, M. E.; COLLINS, N. E.; POTGIETER, F. T.; OOSTHUIZEN, M. C. Sequence variation identified in the 18S rRNA gene of *Theileria mutans* and *Theileria velifera* from the African buffalo (*Syncerus caffer*). **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1-2, p. 132-137, 2013.
- CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; CASADO, N.; GIMENEZ, C.; RUAS, J.; WENDT, L.; ROSA-FARIAS, N.; PINHEIRO, M.; REY-VALEIRON, C.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 3, p. 187–193, 2009.
- GREENE, C. E.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. Cytauxzoonosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of dog and cat**. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 722–733.

- LAINSON, R.; PAPERNA, I.; NAIFF, R. D. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 103-113, 2003.
- LOPES, F. C.; AZEVEDO, S. S.; DANTAS, L. A. B.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, A. S. Occurrence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in captive *Boa constrictor* snakes in the semi-arid of Rio Grande do Norte state, northeastern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1285-1287, 2010.
- MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-561, 2004.
- METZGER, B.; PADUAN, K. S.; RUBINI, A. S.; OLIVEIRA, T. G.; PEREIRA, C.; O'DWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 28–33, 2008.
- MOÇO, T. C.; O'DWYER, L. H.; VILELA, F. C. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1169-1176, 2002.
- NIJHOF, A. M.; PENZHORN, B. L.; LYNEN, G.; MOLLEL, J. O.; MORTEL, P.; BEKKER, C. P. J.; JONGEJAN, F. *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: tick-Borne parasites associated with mortality in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2249–2254, 2003.
- RISTIC, M.; KREIER, J. P. (Ed.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981.
- SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 61–66, 2011.
- SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 565–585, 1996.

6 DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM ANIMAIS SILVESTRES DA FLORESTA AMAZÔNICA DOS ESTADOS DO MATO GROSSO (MT) E PARÁ (PA), BRASIL

6.1 INTRODUÇÃO

A identificação de reservatórios silvestres para agentes Anaplasmataceae é de grande importância, pois pode ajudar na identificação de áreas de possível risco para infecção humana, dado o potencial zoonótico reconhecido desses patógenos (SACCHI et al., 2012).

Os gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, família Anaplasmataceae, constituem bactérias intracelulares obrigatórias transmitidas por carrapatos. Estes organismos são comuns na natureza e têm como hospedeiros animais domésticos e silvestres. Por muitos anos, estes agentes são incriminados por causarem doenças em animais, tendo como consequências desde infecções assintomáticas a manifestações clínicas severas e potencialmente fatais (DUMLER et al., 2001; RYMASZEWSKA; GREYDA, 2008; VIEIRA et al., 2011).

Devido à escassez de dados publicados sobre doenças transmitidas por carrapatos entre animais da fauna Amazônica, o presente trabalho teve como objetivo relatar a detecção molecular de membros da família Anaplasmataceae (*Anaplasma* e *Ehrlichia*) em animais selvagens de vida livre da Floresta Amazônica, dos estados do Mato Grosso e Pará, regiões centro-oeste e norte do Brasil.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

De fevereiro de 2009 a junho de 2012, foram coletados carrapatos e tecidos de animais silvestres de diferentes espécies (mamíferos, aves e répteis) procedentes do Bioma Amazônia dos estados do Mato Grosso (MT) e Pará (PA).

No estado do Mato Grosso as amostras foram obtidas de animais silvestres caçados e utilizados como alimento pelos índios da etnia Tapirapé, na área da

reserva indígena no município de Confresa (10°38'57.0"S/ 51°34'12.6"W) na qual estão distribuídas sete aldeias: Urubu Branco (10°40'16.1"S/51°21'13.8"W), Sapeva (10°48'12.2"S/51°17'12.8"W), Córrego da Onça (10°42'27.5"S/51°18'49"W), Buriti II (10°39'33.6"S/51°17'41.2"W), Codebra (10°52'09.6"S/51°15'37.8"W), Xexéu (10°51'20.6"S/51°18'19.8"W) e Santa Laura (10°36'23.9"S/51°10'47.9"W). Durante a viagem, para a realização das coletas, foram coletados carrapatos e fragmentos de tecidos e de animais silvestres encontrados atropelados na rodovia BR-158, no trecho entre os municípios de Marabá-PA e Confresa-MT.

No estado do Pará, as amostras foram coletadas de animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217) entre os municípios de Santarém (2°24'52"S/54°42'36"W) e Rurópolis (4°05'44"S/ 54°54'37"W), onde está localizada a Floresta Nacional do Tapajós, que faz limite com o Rio Tapajós e com a rodovia BR 163 Santarém-Cuiabá.

Os fragmentos de órgãos internos (pulmões e baço) ou sangue foram coletados, armazenados em microtubos e mantidos a 20°C negativos até a realização das análises moleculares. A extração de DNA dos órgãos foi realizada através de kit comercial (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme as instruções do fabricante. Para todas as extrações foram inclusos controles (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) para indicar contaminação entre amostras durante o procedimento. O DNA de cada amostra extraída foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-Vis, ThermoScientific). Todas as amostras com quantidade acima de 20 ng/μL de DNA foram submetidas às análises moleculares pela PCR.

Todas as amostras de tecido, sangue e carrapatos foram testadas quanto à presença de DNA de bactérias do gênero *Anaplasma* e *Ehrlichia*. Em todas as reações foram utilizados controles negativo (água Milli-Q) e positivo (DNA de *Ehrlichia canis*). As informações dos *primers* utilizados no presente estudo estão descritos no quadro 5.

Quadro 5 - Lista dos *primers* utilizados no presente estudo

Gene / <i>Primers</i>	Agente	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	FA ^a	Referência
16S	Anaplasmataceae			
EHR 16SD		F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345 pb	Inokuma et al.,
EHR 16SR		R- TAGCACTCATCGTTTACAG		2000
Flab	<i>Borrelia</i>			
FlaLL		F- ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	665 pb	
FlaRL		R- GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT		Stromdahl et
FlaLS		F- AACAGCTGAAGAGCTTGGAAAT	354 pb	al., 2003
FlaRS		R- CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
Dsb	<i>Ehrlichia</i>			
DSB 330		F- GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401 pb	Doyle et al.,
DSB 720		R- CTATTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		2005
DSB 380		F- ATTTTATAGRGATTTTCCAATACTTGG	349 pb	Almeida et al.,
		R- CTATTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		2013

^a Fragmento amplificado

Os produtos de PCR, no tamanho esperado para cada ensaio, foram purificados com ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e sequenciados em sequenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) de acordo com as instruções do fabricante utilizando os mesmos *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados para PCR. As sequências parciais obtidas foram submetidas à análise pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 9.0, com nível de significância = 0,05 (5%). Para comparação entre os grupos, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fischer quando necessário.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Mato Grosso

Foram coletadas amostras de tecidos (pulmões, baço e sangue total) de 49 animais silvestres, obtidos através da caça indígena Tapirapé no município de Confresa e encontrados atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT, no estado do Mato Grosso, conforme tabela 11.

Tabela 11 - Espécies de animais silvestres obtidos através de caça indígena e atropelados na rodovia BR-158 entre Marabá-PA e Confresa-MT amostrados no período de setembro de 2010 a junho de 2012

(continua)			
Espécie	Nome popular	N	Tecido^b
Mamíferos			
<i>Akodon</i> sp.	Roedor silvestre	1	P/B
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	P/B
<i>Cavia</i> sp.	Preá	3	P/B
<i>Cerdocyon thous^a</i>	Cachorro-do-mato	2	P/B
<i>Chiropotes</i> sp.	Macaco cuxiú preto	3	P/B
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	1	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	2	P
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasybus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	2	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	2	P/B
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu-peba	2	P/B
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	1	P/B
<i>Micoureus demerarae</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Marsupial	1	P/B
<i>Monodelphis</i> sp.	Marsupial	1	P/B
<i>Nasua nasua^a</i>	Quati	1	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	1	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	2	P/B
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Tapiti	3	P/B
<i>Tamandua tetradactyla^a</i>	Tamanduá-mirim	2	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	2	P/B

Espécie	Nome popular	(conclusão)	
		N	Tecido ^b
Aves			
<i>Ardea cocoi</i>	Garça-moura	1	P
<i>Crax fasciolata</i>	Mutum-de-penacho	3	P
<i>Megascops choliba</i>	Coruja-do-mato	1	P
<i>Pauxi tuberosa</i>	Mutum-cavalo	1	P
<i>Penelope superciliaris</i>	Jacupemba	2	P
Répteis			
<i>Caiman crocodilos</i>	Jacaretinga	3	P/F
<i>Kinosternon scorpioides</i>	Tartaruga aquática	2	ST
Total		49	

^a Animais encontrados atropelados na BR-158

^b P - pulmões; B - baço; ST - sangue total; F - fígado

N - número de animais

Na PCR para o fragmento de 345 pb do gene 16S rRNA para membros da família Anaplasmataceae, 4 (8,2%) animais foram positivos em amostras de pulmões e baço, sendo 1 (100%) amostra de veado-mateiro (*Mazama americana*), 1 (100%) de cateto (*Pecari tajacu*) e 2 (100%) de queixada (*Tayassu pecari*). As sequências geradas a partir dos produtos amplificados foram editadas e analisadas pelo BLAST, apresentando similaridade de 97% (335/345) com *Anaplasma phagocytophilum* (JN558811) em veado-mateiro (350pb); 99% (304/306) *Anaplasma phagocytophilum* (JX914659, KC916738, AF470699) em cateto e queixada (306pb). Todas as amostras positivas para o fragmento do gene 16S rRNA de *Anaplasmataceae* foram novamente testadas na PCR para o fragmento do gene *dsb* específico para o gênero *Ehrlichia*, seguido de *hemi-nested*, e destas somente 1 (2%) animal foi positivo, 1 (50%) queixada. O produto amplificado foi sequenciado e analisado pelo BLAST, apresentando similaridade de 100% (284/284) com *Ehrlichia* sp. clone J6 (HQ388287), previamente relatado em onça-pintada no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Todas as amostras testadas foram negativas quanto a presença de DNA de *Borrelia*. Os resultados dos sequenciamentos estão expostos na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA de *amplicons*) de bactérias do gênero *Anaplasma* e *Ehrlichia* em tecidos coletados de animais silvestres da floresta Amazônica do município de Confresa, estado do Mato Grosso (MT), Brasil

(continua)

Espécie	Nº Examinados	Gene			
		16S Rrna		Dsb	
		Nº Pos. (%)	CSGB ^a	Nº Pos. (%)	CSGB ^a
Mamíferos					
<i>Akodon</i> sp.	1	0	*	0	*
<i>Cabassous unicinctus</i>	1	0	*	0	*
<i>Cavia</i> sp.	3	0	*	0	*
<i>Sapajus</i> sp.	2	0	*	0	*
<i>Cerdocyon thous</i> ^b	2	0	*	0	*
<i>Chiropotes</i> sp.	3	0	*	0	*
<i>Coendou prehensilis</i>	1	0	*	0	*
<i>Cuniculus paca</i>	2	0	*	0	*
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	0	*	0	*
<i>Dasypus novemcinctus</i>	2	0	*	0	*
<i>Didelphis marsupialis</i>	2	0	*	0	*
<i>Euphractus sexcinctus</i>	2	0	*	0	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	1	0	*	0	*
<i>Mazama americana</i>	1	1 (100)	97% <i>A. phagocytophilum</i> (JN558811)	0	*
<i>Micoureus demerarae</i>	1	0	*	0	*
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	1	0	*	0	*
<i>Monodelphis</i> sp.	1	0	*	0	*
<i>Nasua nasua</i> ^b	1	0	*	0	*
<i>Pecari tajacu</i>	1	1 (100)	99% <i>A. phagocytophilum</i> (JX914659)	0	*
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	3	0	*	0	*

(conclusão)

Espécie	N° Examinados	Gene			
		16S rRNA		Dsb	
		N° Pos. (%)	CSGB ^a	N° Pos. (%)	CSGB ^a
<i>Tamandua tetradactyla</i> ^b	2	0	*	0	*
<i>Tayassu pecari</i>	2	2 (100)	99% <i>A. phagocytophilum</i> (JX914659)	1 (50)	100% <i>Ehrlichia</i> spp. (HQ388287)
Aves					
<i>Ardea cocoi</i>	1	0	*	0	*
<i>Crax fasciolata</i>	3	0	*	0	*
<i>Megascops choliba</i>	1	0	*	0	*
<i>Pauxi tuberosa</i>	1	0	*	0	*
<i>Penelope superciliaris</i>	2	0	*	0	*
Répteis					
<i>Caiman crocodilus</i>	3	0	*	0	*
<i>Kinosternon scorpioides</i>	2	0	*	0	*
Total	49	4 (8.2)		1 (2.0)	

^a CSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

^b Animais encontrados atropelados na BR-158

N° Examinados – número de animais examinados

N° Pos. – número de animais positivos

6.3.2 Pará

Amostras de tecidos (pulmões e baço) foram coletadas de 132 animais silvestres atropelados ao longo do trecho da BR 163 (Km 50-Km 217), de acordo com a tabela 13.

Tabela 13 - Espécies de mamíferos silvestres atropelados entre os Km 50 e 217 da BR 163, entre os municípios de Santarém e Rurópolis, amostrados no período de fevereiro de 2009 a novembro de 2011

Espécie	Nome popular	Nº	Tecido^a
<i>Alouatta nigerrima</i>	Bugio-preto	11	P/B
<i>Bradypus variegatus</i>	Preguiça-comum	1	ST
<i>Cabassous unicinctus</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	P/B
<i>Callicebus moloch</i>	Zogue-zogue	1	P/B
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	1	ST
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	6	P/B
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	33	P/B
<i>Dasyprocta azarae</i>	Cutia	1	P/B
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	30	P/B
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá-comum	17	P/B
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	1	P/B
<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	2	P/B
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Cuíca	2	P/B
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	2	P/B
<i>Proechimys</i> sp.	Roedor silvestre	5	P/B
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	1	P/B
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	8	P/B
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	9	P/B
Total		132	

^aP- pulmões; B- baço; ST- sangue total

N – número de animais

Na PCR para o fragmento de 345 pb do gene 16S rRNA para membros da família Anaplasmataceae, 13 (9,8%) animais foram positivos em amostras de pulmão e baço, sendo 1 (100%) amostra de preguiça-comum (*Bradypus variegatus*), 1 (50%) de veado-mateiro (*Mazama americana*), 2 (100%) de cateto (*Pecari tajacu*) e 9 (100%) de queixada (*Tayassu pecari*). As sequências geradas a partir dos

produtos amplificados foram editadas e analisadas pelo BLAST, apresentando similaridade de 99% (304/306) com *Anaplasma phagocytophilum* em preguiça-comum (306pb) (GU064900), cateto e queixada (306pb) (JX914659) e 100% (306/306) com *Anaplasma bovis* em veado-mateiro (AB723716). Todas as amostras positivas para o fragmento do gene 16S rRNA de *Apanaplasmataceae* foram novamente testadas na PCR para o fragmento de do gene *dsb* específico para o gênero *Ehrlichia*, seguido de *hemi-nested*, e destas 3 (2,3%) foram positivas, sendo 1 (100%) de preguiça-comum e 2 de queixada (22,2%). Os produtos amplificados foram sequenciados e analisados pelo BLAST, apresentando similaridade de 87% e 98% com *Ehrlichia* sp. clone J6 (HQ388287) em preguiça-comum e queixada, respectivamente (Tabela 14). Todas as amostras testadas foram negativas quanto à presença de DNA de *Borrelia*.

6.3.3 Análise estatística

Para a família Anaplasmataceae, não houve associação da positividade com o local ($p=1$), uma vez que a proporção de positivos no Mato Grosso (8,2%) é muito similar à proporção de positivos no Pará (9,85%).

Para o gênero *Ehrlichia*, também não houve associação da positividade com o local ($p=1$), uma vez que a proporção de positivos no Mato Grosso (2,0%) foi quase a mesma da proporção de positivos no Pará (2,3%).

Tabela 14 - Resultados da detecção molecular (PCR seguido de sequenciamento de DNA de *amplicons*) de bactérias do gênero *Anaplasma* e *Ehrlichia* em tecidos coletados de animais silvestres da floresta Amazônica do município de Santarém, estado do Pará (PA), Brasil

Espécie	Nº Examinado	Gene			
		16S		Dsb	
		Nº Pos. (%)	CSGB ^a	Nº Pos. (%)	CSGB ^a
<i>Alouatta nigerrima</i>	11	0	*	*	*
			99% <i>A. phagocytophilum</i> (GU064900)	1 (100)	87% <i>Ehrlichia</i> sp. (HQ388287)
<i>Bradypus variegatus</i>	1	1	*	*	*
<i>Cabassous unicinctus</i>	1	0	*	*	*
<i>Callicebus moloch</i>	1	0	*	*	*
<i>Choloepus didactylus</i>	1	0	*	*	*
<i>Coendou prehensilis</i>	6	0	*	*	*
<i>Cuniculus paca</i>	33	0	*	*	*
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	0	*	*	*
<i>Dasyprocta novemcinctus</i>	30	0	*	*	*
<i>Didelphis marsupialis</i>	17	0	*	*	*
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	*	*	*
<i>Mazama americana</i>	2	1 (50)	100% <i>A. bovis</i> (AB723716)	*	*
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	2	0	*	*	*
			99% <i>A. phagocytophilum</i> (JX914659)	*	*
<i>Pecari tajacu</i>	2	2 (100)	*	*	*
<i>Proechimys</i> sp.	5	0	*	*	*
<i>Sapajus</i> sp.	1	0	*	*	*
<i>Tamandua tetradactyla</i>	8	0	*	*	*
			99% <i>A. phagocytophilum</i> (JX914659)	2 (22.2)	98% <i>Ehrlichia</i> sp. (HQ388287)
<i>Tayassu pecari</i>	9	9 (100)			
Total	132	13 (9.8)		3 (2.3)	

^a CSGB: similaridade mais próxima no Genbank (número de acesso entre parênteses)

Nº Examinado – número de animais examinados

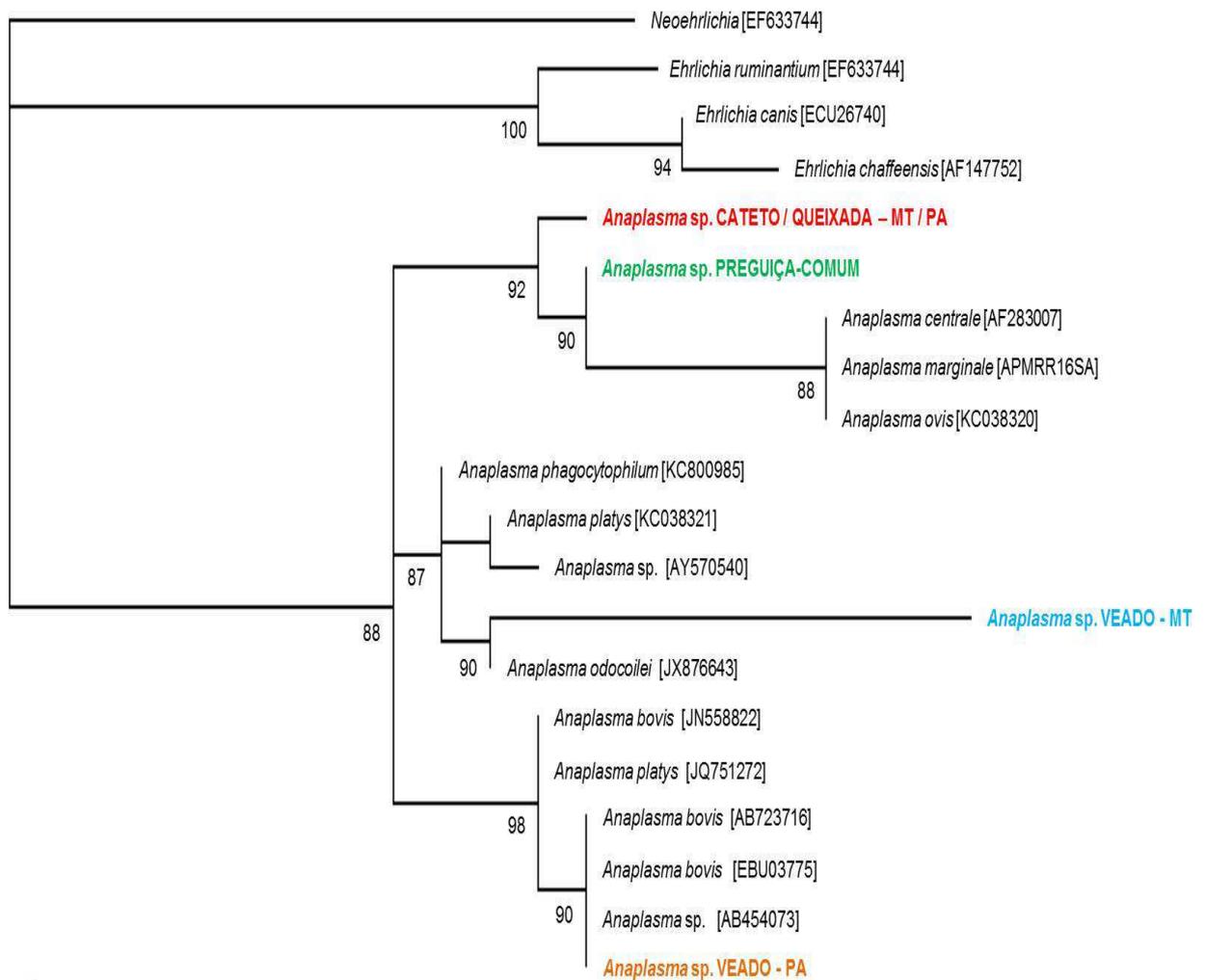
Nº Pos. – número de animais positivos

6.3.4 Análises filogenéticas

As topologias obtidas pelo método de máxima parcimônia para ambos os genes utilizados evidenciou a separação das sequências obtidas em dois gêneros, *Anaplasma* e *Ehrlichia*. As sequências pertencentes ao gênero *Anaplasma* foram segregadas em dois ramos: um com as amostras provenientes de cateto, quexada e preguiça-comum e *A. centrale*, *A. marginale* e *A. ovis* com altos valores de suporte de ramos (92% de bootstrap); outro ramo com a sequência obtida de veado-mateiro agrupado com *A. odocoilei* (90% de bootstrap) (Figura 7).

Todas as sequências obtidas com o gene *dsb* para os parasitas do gênero *Ehrlichia* provenientes de hospedeiros das ordens Artiodactyla e Xenarthra foram segregadas em um único ramo juntamente com sequências obtidas de carnívoros brasileiros, cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e onça-pintada (*Panthera onca*), suportados por valores de bootstrap acima de 75% (Figura 8).

Figura 7 - Árvore filogenética das espécies *Anaplasma* baseada nas sequências parciais no gene ribossômico 16S rRNA pelo método de máxima parcimônia (MP)

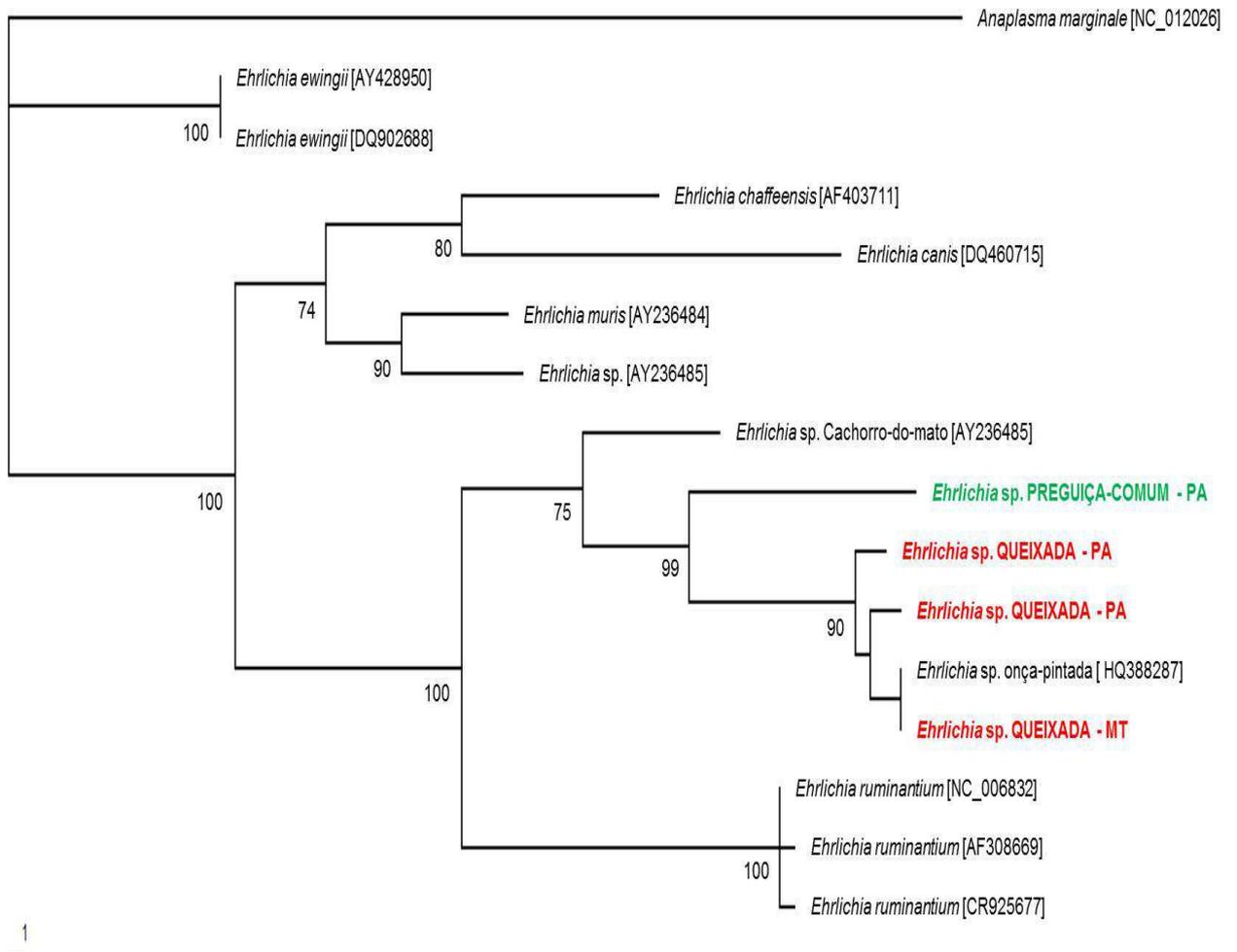


1

Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 20 sequências de *Anaplasma* e *Ehrlichia*, utilizando como grupo externo *Neoehrlichia* (305 caracteres, 28 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas.

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, outubro, 2013.

Figura 8 - Árvore filogenética das espécies de *Ehrlichia* baseada nas sequências parciais no gene *dsb* pelo método de máxima parcimônia (MP)



Árvore filogenética baseada no gene *dsb* pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 16 sequências de *Ehrlichia* e *Anaplasma* como grupo externo (187 caracteres, 79 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas.

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, outubro, 2013.

6.4 DISCUSSÃO

No Brasil, existem estudos com agentes da família *Anaplasmataceae* em diversas espécies de animais silvestres, tanto de vida livre quanto de cativeiro, como felídeos (ANDRÉ et al., 2010; WIDMER et al., 2011), aves (MACHADO et al., 2012), cervídeos (MACHADO et al., 2006; SACCHI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012) e canídeos (ALMEIDA et al., 2013); contudo são escassos trabalhos com animais silvestres de vida livre da fauna Amazônica.

Nos estados do Mato Grosso e Pará, amostras de tecido de veado-mateiro (*Mazama americana*) foram positivas e das sequências obtidas, uma apresentou similaridade à espécie *Anaplasma phagocytophilum* (97%) e outra identidade com *A. bovis* (100%). Em cervídeos, no Brasil, foram realizados estudos em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) capturados na fronteira entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, onde foram detectados animais positivos, pela PCR, para *Anaplasma marginale*, *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia chaffeensis* (MACHADO et al., 2006; SACCHI et al., 2012); Outra pesquisa realizada com cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), no estado de Minas Gerais, encontrou animais positivos para *Anaplasma bovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma* spp. e *E. chaffeensis* (SILVEIRA et al., 2012).

Todos os catetos (*Pecari tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*) de ambos estados, foram positivos para *Anaplasma*, apresentando similaridade de 99% com a espécie *Anaplasma phagocytophilum*. Apesar da alta similaridade entre a espécie detectada e *A. phagocytophilum*, as análises filogenéticas mostraram que são espécies distintas e segregadas com *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis* e *A. odocoilei*. As sequências provenientes de animais silvestres obtidas neste estudo foram agrupadas com sequências de *Anaplasma* que infectam bovinos. Tal fato pode refletir os poucos estudos efetuados com animais silvestres no Brasil que objetivam conhecer a diversidade destes parasitas ou ainda o crescente processo de supressão de áreas florestadas com subsequente substituição por áreas de pastagens e criação de bovinos, principalmente no estado do Mato Grosso (SOUZA et al., 2013). Além disso, as baixas taxas de divergências entre as sequências obtidas quando comparadas as espécies já conhecidas e causadoras de doenças em animais domésticos podem refletir a introdução de novos patógenos nas

populações silvestres do Brasil. Novos estudos devem ser conduzidos para comparar outros marcadores genéticos dos parasitas obtidos de ambas populações.

Três amostras de queixada apresentaram co-infecção, sendo positivas tanto para *Anaplasma* quanto para *Ehrlichia*. As sequências obtidas das amostras do Pará apresentaram 98% de similaridade e a do Mato Grosso apresentou 100% com *Ehrlichia* sp. clone J6, recentemente detectada em onça pintada (*Panthera onca*) do estado do Mato Grosso do Sul (WIDMER et al., 2011) e com cachorro-do-mato (*C. thous*) do estado do Espírito Santo, sugerindo uma íntima relação na transmissão de patógenos entre presa e predador, provavelmente por infecções orais. Até o presente, não foram encontrados trabalhos científicos na literatura para comparação de resultados, sendo este o primeiro trabalho a relatar no Brasil a infecção dessas espécies, *P. tajacu* e *T. pecari*, por membros da família Anaplasmataceae.

No Pará, em preguiça-comum (*Bradypus variegatus*) também houve co-infecção, sendo detectados *Anaplasma* e *Ehrlichia*, e as sequências obtidas apresentaram similaridade de 99% com *A. phagocytophilum* e 87% com *Ehrlichia* sp. de onça pintada do estado do Mato Grosso do Sul (WIDMER et al., 2011). Este também é o primeiro relato de infecção por agentes *Anaplasmataceae* em *B. variegatus* no Brasil.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram detectados agentes da família *Anaplasmataceae* em espécies animais e regiões ainda não estudadas, revelando o enorme potencial para pesquisas aplicadas a animais silvestres da fauna Amazônica, cuja literatura ainda é bastante escassa em relação à ocorrência de patógenos, bem como a interação parasita hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE P. A. N.; SILVA K. F.; NAKAGHI A. C. H. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017–1023, 2010.
- DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.
- INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219–4221, 2000.
- MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; WERTHER, K., SOUSA, E.; GAVIOLI, F. A.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 705-708, 2012.
- MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ, M. P. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.
- RYMASZEWSKA, A.; GREINDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 11, p. 573–584, 2008.
- SACCHI, A. B. V.; DUARTE, J. M. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian

marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, p. 325–334, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular Detection of Tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, p. 353–360, 2012.

SOUZA-JUNIOR, C.; SIQUEIRA, J.; RIBEIRO, J.; SALES, M. **Desmatamento e degradação florestal do bioma Amazônia (2000-2010)**. Belém: Imazon, 2013. Disponível em: <<http://www.imazon.org.br/publicacoes/outros/desmatamento-e-degradacao-florestal-no-bioma-amazonia-2000-2010>>, acesso em: 13 out. 2013.

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

WIDMER, C. E.; AZEVEDO, F. C. C.; ALMEIDA, A. P.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p.1001-1005, 2011.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WANG, G.; SCHWARTZ, I.; WORMSER, G. P. Diagnosis of Lyme borreliosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 484–509, 2005.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, p. 11-29, 1983.
- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V. A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 279-282, 1997.
- ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 203– 206, 2012.
- ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.
- ALMOSNY, N. R. P. ***Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935):** Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses.** Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p. 80-87.
- ALLSOPP, B. A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 123-135, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 134-138, 2010.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

- BANETH, G.; SHEINER, A.; EYAL, O.; HAHN, S.; BEAUFILS, J. P.; ANUG, Y.; TALMI-FRANK, D. Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 102, p. 1-10, 2013.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARLETT, P. C.; JUDGE, L. J. The role of epidemiology in public health. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**, v. 16, n. 2, p. 331-336, 1997.
- BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue Scientifique et Technique**, v. 29, n. 1, p. 149-160, 2010.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo/BR: Vox /ICTTD-3/ Butantan, 2006. 223 p.
- BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.
- BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Agentes Rickettsiais de doenças animais; as Riquetsias. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-275.
- BIRKENHEUER, A. D.; HORNEY, B.; BAILEY, M.; SCOTT, M.; SHERBERT, B.; CATTO, V.; MARR, H. S.; CAMACHO, A-T.; BALLMAN, A. E. *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3/4, p. 179-182, 2010.
- BOSLER, E. M. Tick vectors and hosts. In: COYLE, P. K. (Ed.). **Lyme disease**. Boston: Mosby Year Book, 1993. p. 18-26.
- BRASIL. Ministério do meio ambiente. **Biomass brasileiros**. 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/geografia/biomass-e-vegetacao/biomass-brasileiros>>. Acesso em: 08 nov. 2011.
- BRUMPT, E. **Précis de parasitologie**. Paris: Collection de Précis Médicaux Masson & Cie Éditeurs, 1927. 1452 p.
- BULAT, S. A.; MOKROUSOV, I. V.; PODLIPAEV, S. A. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (Universally Primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. **European Journal of Protistology**, v. 35, n. 3, p. 319-326, 1999.
- BURGESS, E. C.; AMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A.; EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp with *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 355-359, 1986.

- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Revista del Instituto de la Salud y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.
- CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human Ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2004.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1998.
- CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. São Paulo: Artmed, 1998. 672 p.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiology Reviews**, v. 57, n. 4, p. 953-994, 1993.
- CLEAVELAND, S.; DYE, C. Maintenance of a microparasite infecting several host species: rabies in the serengeti. **Parasitology**, v. 111, p. S33-S47, 1995.
- CLEAVELAND, S.; HESS, G. R.; DOBSON, A. P.; LAURENSEN, M. K.; McCALLUM, H. I.; ROBERTS, M. G.; WOODROFFE, R. The role of pathogens in biological conservation. In: HUDSON, P. J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B. T.; HEESTERBEEK, H.; DOBSON, A. P. (Ed.). **The ecology of wildlife diseases**. New York: Oxford University Press, 2002. p.139-150.
- CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, 2001. p. 493-499.
- COSTA, J. O.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M. P.; BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte- Brazil. **Arquivos Escola Veterinária UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.
- COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 853-859, 2005.
- COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; ZÄHLER-RINDER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 257-260, 2009.
- COURTENAY, O.; QUINELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, O. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, n. 5, p. 407-414, 2002.
- COYLE, P. K. **Lyme disease**. Boston: Mosby Year Book, 1993. 235 p.
- CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J. L.; CASADO, N.; FARIAS, N. A.; SOARES, M. P.; MÜLLER, G.; BRUMT, J. G.; BERNE, M. E.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species

(Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 93-99, 2006.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias dos Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, p. 30-46, 2009.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 103- 116, 2001.

DAVIS, D. S.; ROBINSON, R. M.; CRAIG, R. M. Naturally occurring hepatozoonoses in a coyote. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 244-245, 1978.

DEEM, S. L.; KARESH, W. B.; WEISMAN, W. Putting theory into practice: Wildlife health in conservation. **Conservation Biology**, Sunderland, v. 15, n. 5, p. 1224-1233, 2001.

DEANE, L. M. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I – Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, n. 1, p. 15-28, 1961.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON JR, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives, Review. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

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

- EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E. A.; DEMMA, L. J.; ZAMBRANO, M. L.; BLAU, D. M.; DASCH, G. A. Isolation and Identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5569–5577, 2006.
- ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIEMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution and ecological 'preferences' of tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), anectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283-292, 2004.
- EWING, S. A.; PANCIERA, R. J. American canine hepatozoonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 688-697, 2003.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 200-201, 2008.
- FISHMAN, Z.; GONENA, L.; HARRUS, S.; STRAUSS-AYALI, D.; KING, R.; BANETH, G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 21–26, 2004.
- FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K. R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 1-7, 2005.
- FORLANO, M. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K. S. C.; FERNANDES, K. R.; LINHARES, G. F. C.; EWING, S. A.; MASSARD C. L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 21–30, 2007.
- GABRIEL, M. W.; BROWN, R. N.; FOLEY, J. E.; HIGLEY, J. M.; BOTZLER, R. G. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 2, p. 344–354, 2009.
- GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. 1387 p.
- GILL, J. S.; MCLEAN, R. G.; SHRINER, R. B.; JOHNSON, R. C. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 444-451, 1994.
- GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, A.; MIGUEL, F. A.; DOMINGUEZ-PEÑAFIEL, G. A molecular survey of *Piroplasmida* and *Hepatozoon*

isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 147-150, 2009.

GODDARD, J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal Medical Entomology**, v. 40, p. 686–689, 2003.

GONDIM, L. F. P.; KONOYASGAWA, A.; ALENCAR, N. X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA, R. F.; FRANCO, S. R. V. Canine Hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 319-323, 1998.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTE, M. A.; PALMA, A. R. T.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J. C.; CUBA CUBA, C. A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 323-330, 2004.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 15-25, 2007.

HEINZEN, R. A.; HACKSTADT, T.; SAMUEL, J. E. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 149-154, 1999.

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

HONIGBERG, B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: LUDVIK, J.; LOM, J.; VAVRA, J. (Ed.). **Progress in protozoology**. New York: Academic Press, 1963. p. 68.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

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

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite & Vectors**, v. 2, p. S4, 2009. (Supplement 1).

JAENSON, T. G. T.; TALLEKLINT, L. Lyme borreliosis spirochetes in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) and the varying hare on isolated islands in the Baltic Sea. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 339-343, 1996.

JONGEJAN, G.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3–14, 2004.

KARAGENC, T. I.; PASA, S.; KIRLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H. B.; OZON, Y. H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 113-119, 2006.

KAZAR, J. *Coxiella burnetii* Infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 105–114, 2005.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P. P. V. P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 294–303, 2008.

KIMURA, K.; ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KAMEWAKA, Y.; NISHIKAWA, T.; ISHII, N.; FUJII, N. Detection of Lyme disease spirochetes in skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1641-1642, 1995.

KOCAN, A. A.; BRESHEARS, M.; CUMMINGS, C.; PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; BARKER, R. W. Naturally occurring Hepatozoonosis in coyotes from Oklahoma. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 1, p. 86–89, 1999.

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

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

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M. B.; McBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 189-195, 2007a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007b.

LABRUNA, M. B.; PAULA, C. D.; LIMA, T. F.; SANA, D. A. Ticks (Acari:Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1133-1136, 2002.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. L.; CAMARGO, M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 1073-1081, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil,

where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 90-98, 2004b.

LAMAS, C.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; FAVACHO, A. R. M.; KIRSTEN, A. H.; SILVA, A. P. M.; LEMOS, E. R. S. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 140–141, 2009.

LANE, R. S.; BROWN, R. N.; PIESMAN, J.; PEAVEY, C. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 3, p. 417-424, 1994.

LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M. A. M.; ALMEIDA, D. N. P.; MOREIRA, N.; SILVA, R. G.; BARREIRA, J. D.; LAMAS, C. C.; FAVACHO, A. R.; DAMASCO, P. V. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 85-87, 2011.

LI, Y.; WANG, C.; ALLEN, K. E.; LITTLE, S. E.; AHLUWALIA S. K.; GAO, D.; MACINTIRE, D. K.; BLAGBURN, B. L.; KALTENBOECK, B. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 50-58, 2008.

LÓPEZ, J.; RIVERA, M.; CONCHA, J. C.; GATICA, S.; LOEFFEHOLZ, M.; BARRIGA, O. Serologic evidence for human Ehrlichiosis in Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 131, n. 1, p. 67-70, 2003.

LORD, R. D.; LORD, V. R.; HUMPHREYS, J. G.; MCLEAN, R. G. Distribution of *Borrelia burgdorferi* in host mice in Pennsylvania. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2501-2504, 1994.

LOUW, M.; ALLSOPP, M. T. E. P.; MEYER, E. C. *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. **South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 95, n. 12, p. 948-950, 2005.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ, M. P. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.

MAGNARELLI, L. A.; DUMLER, J. S.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; FIKRIG, E. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 3054-3057, 1995.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-561, 2004.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick

genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, p. 478-484, 1998.

MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme diseases-like syndrome in Brazil is it a new tick borne diseases or Lyme disease, variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 443-456, 2007.

MARRIE, T. J. Q fever – A review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 555-563, 1990.

MARTÍNEZ, M. C.; GUTIÉRREZ, C. N.; MONGER, F.; RUIZ, J.; WATTS, A.; MIJARES, V. M.; ROJAS, M. G.; TRIANA-ALONSO, F. J. *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 519-520, 2008.

MARTINS, T. F.; CUROTTO, S. M. R.; SILVA, F. M. P.; TEIXEIRA, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S. *Ancylostoma* sp. e *Babesia* sp. associadas ao parasitismo por *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI IXODIDAE) em Raposinha - do - campo (*Pseudalopex vetulus*) (CARNIVORA CANIDAE) no Centro de Recuperações de Animais Silvestres da FMVZ - Unesp - Botucatu - SP. (Resumo) In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLOGICOS, 15., 2006. **Anais...** 2006. p. 15.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI; D. M. B.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 1, p. 75–99, 2010.

MASSARD, C. A. *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) caso do Brasil, como uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1979.

MASUZAWA, T.; SUZUKI, H.; KAWABATA, H.; ISHIGURO, F.; TAKADA, N.; YANO, Y.; YANAGIHARA, I. Identification of spirochete isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1392-1394, 1995.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Q fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 518-553, 1999.

MATJILA, P. T.; LEISEWITZ, A. L.; JONGEJAN, F.; BERTSCHINGER, H. J.; PENZHORN, B. L. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 123-127, 2008.

McCULLY, R. M.; BASSON, P. A.; BIGALKE, R. D.; DE-VOS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonoses of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 117–134, 1975.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, p. 379-405, 2011.

- METZGER, B.; PADUAN, K. S.; RUBINI, A. S.; OLIVEIRA, T. G.; PEREIRA, C.; O'DWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 28–33, 2008.
- MUNDIM, A. V.; JACOMINI, J. O.; MUNDIM, M. J. S.; ARAÚJO, S. F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 259-261, 1992.
- MUNDIM, A. V.; MORAIS, I. A.; TAVARES, M.; CURY, M. C.; MUNDIM, M. J. S. Clinical and hematological sings associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 3-8, 2008.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR, H. B.; DEERFIELD II, D. W. **GeneDoc**: analysis and visualization of genetic variation, EMBNEW.NEWS, v. 4, n. 14, 1997. Disponivel em: < <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2012.
- NIETO, N. C.; LEONHARD, S.; FOLEY, J. E.; LANE, R. S. Coinfection of Western Gray Squirrel (*Sciurus griseus*) and other Sciurid Rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 291–296, 2010.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 143-150, 2001.
- OHASHI, N.; INAYOSHI, M.; KITAMURA, K.; KAWAMORI, F.; KAWAGUCHI, D.; NISHIMURA, Y.; NAITOU, H.; HIROI, M.; MASUZAWA, T. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1780-1783, 2005.
- OLANO, J. P. Rickettsial infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 187-196, 2005.
- OLIVEIRA, K. A.; PINTER, A.; MEDINA-SANCHEZ, A.; BOPPANA, V. D.; WIKEL, S. K.; SAITO, T. B.; SHELITE, T.; BLANTON, L.; POPOV, V.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H.; GALVAO, M. A. M.; MAFRA, C.; BOUYER, D. H. *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1282-1284, 2010.
- PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia belli* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.
- PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J.; CATROXO, M. H. B.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov. infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207-5211, 2011.
- PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMNER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in

Argentina. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 687-692, 2008.

PALUDO, G. R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A. K.; MACINTIRE, D.; WHITLEY, E. M.; BOUDREAUX, M. K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B. L.; DYKSTRA, C. C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, v. 97, p. 167–170, 2005.

PARAENSE, W. L.; VIANNA, Y. L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 13, p. 595-603, 1948.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v. 36, p. 469–492, 2005.

PAROLA, P.; RAOULT, T. D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, 2001.

PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. **Boletín De la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 20, p. 1112-1124, 1941.

PAVLOVSKY, E. N. **Natural Nidality of Transmissible Diseases**. Moscow: Peace Publishers, 1965. 250 p.

PEREIRA, R. H. M. A.; SOARES, H. S.; LABRUNA, M. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. D.; ALVES, N. D.; BEZERRA, A. C. D. S. Hepatozoonose canina: relato do primeiro diagnóstico molecular em cão na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 65., 2013, Recife. **Anais...** Recife: RASBPC, 2013. p. 256.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals New York Academy Science**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy Science**, v. 1078, p. 523-529. 2006.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; EREMEEVA, M.; GRAVES, S.; KELLY, P. J.; OTEO, J. A.; SEKEYOVA, Z.; TAMURA, A.; TARASEVICH, I.; ZHANG, L. Naming of Rickettsiae and Rickettsial Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 1-12, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 694-719, 1997.

REEVES, W. K.; LOFITS, A. D.; SANDERS, F.; SPINKS, M. D.; WILLS, W.; DENISON, A. M.; DASCH, G. A. *Borrelia*, *Coxiella* and *Rickettsia* in *Carion capensis*

(Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus accidentalis*) rookery in South Carolina, USA. **Experimental & Applied Acarology**, v. 39, p. 321-329, 2006.

REGNERY, R. L.; SPRUIL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portion of two Rickettsial gene. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1576-1589, 1991.

RIPOLL, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of Rickettsial spotted fever and Ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, 1999.

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

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, p. 91-93, 2005.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; LOPES, V. A.; O'DWYER, L. H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 895-899, 2008.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; PEREZ, R. R.; RIBOLLA, P. E. M.; O'WYER, L. H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 168-171, 2006.

SAHNI, S. K.; RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. **Future Microbiology**, v. 4, p. 323-339, 2009.

SCOLA, B. L. Current laboratory diagnosis of Q fever. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 257-262, 2002.

SERRA-FREIRE, N. M.; TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM, A.; GAZÊTA, G. S.; NUNES, A. L. V.; YADA, H. S.; TEIXEIRA, C. Babesiose associada ao parasitismo por carrapatos em lobo guará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 1993, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: CSBZ, 1993. p. 161.

SHAW, J. J.; MONTEGOMERY, G. G. (Ed.). **The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilingues**. Washington DC Smithsonian Institute Press, 1985. p. 279-292.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SICILIANO, R. F.; RIBEIRO, H. B.; FURTADO, R. H. M.; CASTELLI, J. B.; SAMPAIO, R. O.; SANTOS, F. C. P.; COLOMBO, S.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. Endocardite por *Coxiella burnetii* (febre Q). Doença rara ou pouco diagnosticada? Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 409-412, 2008.

- SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p. 1111-1113, 2007.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p.168-174, 2006.
- SKOTARCZAK, B. Canine Ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 10, n. 2, p. 137-141, 2003.
- SOUZA, B. M. P. S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; GONDIM, L. F. G.; FRANKE, C. R. Prevalence of Ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.
- SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201–206, 2010.
- SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 357-361, 2009.
- STEERE, A. C. Lyme disease. **New England Journal of Medicine**, v. 31, p. 586-597, 1989.
- STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1093-1101, 2004.
- STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; KORNBLATT, A. N. The spirochetal etiology of Lyme disease. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 13, p. 733-740, 1983.
- STROMDAHL, E.; WILLIAMSON, P.; KOLLARS, T.; EVANS, S. R.; BARRY, R. K.; VINCE, M. A.; DOBBS, N. A. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.
- SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C. Z.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16s ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90-93, 2001.
- SWOFFORD, D. L. PAUP: **Phylogenetic analysis using parsimony**. Beta Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer and Associates, 2002.
- TEIXEIRA, M. M. G.; BORGHESAN, T. C.; FERREIRA, R. C.; SANTOS, M. A.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L. B.; MILDER, R. V.; SOUZA, W.; CAMARGO, E. P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the

description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, v. 162, p. 503–524, 2011.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 722-736.

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

THOMPSON, R. C. A.; KUTZ, S. J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 678-693, 2009.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 223-230, 2006.

TRAVI, B. L.; OSÓRIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of new world visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, p. 73-75, 1998.

UMEZAWA, E. S.; SOUZA, A. I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; CAMACHO, A. A.; STOLF, A. M. S.; TEIXEIRA, M. M. G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 15–20, 2009.

VALADAS, S.; GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Prevalence of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 521-524, 2010.

VICENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D. K.; BANETH, G. Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Small Animals**, v. 19, n. 1, p. 51-62, 2003.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMDSEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. New York: Academic Press, 1976. p. 1-34.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317-1331, 1994.

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

- VILCINS, I. M. E.; UJVARI, B.; OLD, J. M.; DEANE, E. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the northern territory, Australia. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 434–442, 2009.
- WALLACE, F. G. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: LUMSDEN W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. New York: Academic Press, 1979. p. 213-240.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 124-193, 1966.
- WALLACE, F. G.; CAMARGO, E. P.; MCGHEE, R. B.; ROITMAN, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology**, v. 30, p. 308-313, 1983.
- WALKER, D. H.; DUMLER, S. Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 121, p. 785-791, 1997.
- WALKER, J. B.; OLWAGE, A. The tick vertos of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 353-379, 1987.
- WALKER, E. D.; MCLEAN, R. G.; SMITH, T. W.; PASKEWITZ, S. M. *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and *Peromyscus leucopus* in northeastern Wisconsin. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n.1, p.165-168, 1996.
- WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.
- WEISS, E.; MOULDER, J. W. The Rickettsias and Chlamydias. In: KREIG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 687-739.
- WIDMER, C. E.; AZEVEDO, F. C. C.; ALMEIDA, A. P.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1001-1005, 2011.
- WOLDEHIWET, Z. Q fever (Coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 93–100, 2004.
- YU, X. J.; WALKER, D. H. The order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community** 3rd ed. New York: Springer-Verlag. 2003. Disponível em: <<http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>>, acesso em: 25 jun. 2013.