RICARDO CORASSA ARRAIS

**Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos
(*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon*
spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon
brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque
Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**

São Paulo

2013

RICARDO CORASSA ARRAIS

Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

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.2877
FMVZ

Arrais, Ricardo Corassa

Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil / Ricardo Corassa Arrais. -- 2013.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - 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. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Carrapatos. 2. Lobo-guará. 3. Anaplasmataceae. 4. Rickettsiales. 5. *Babesia*. I. Título.

ERRATA

ARRAIS, R. C. Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	...Hepatozoon ssp e Rickettsia spp)	...Hepatozoon ssp and Rickettsia spp)
Abstract	1º	...Hepatozoon ssp e Rickettsia spp)	...Hepatozoon ssp and Rickettsia spp)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma spp*, *Babesia spp*, *Ehrlichia spp*, *Hepatozoon spp* e *Rickettsia spp*) em lobos guará e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil", protocolado sob o nº 2510/2011, utilizando 200 (duzentos) cães e 50 (cinquenta) lobos-guarás, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, 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 e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Occurrence of tick-borne pathogens (*Anaplasma spp*, *Babesia spp*, *Ehrlichia spp*, *Hepatozoon spp* and *Rickettsia spp*) in maned wolves and domestic dogs at Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, Brazil", protocol number 2510/2011, utilizing 200 (two hundred) dogs and 50 (fifty) maned wolves, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, 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 and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 20 de março de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Autorização para Atividades com Finalidade Científica

Ministério do Meio ambiente, MMA

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 11124-6	Data da Emissão: 12/06/2012 17:41
Dados do titular	
Nome: ROGERIO CUNHA DE PAULA	CPF: 166.165.498-36
Título do Projeto: Biologia Comportamental e Conservação do Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) no cerrado do Estado de Minas Gerais	
Nome da Instituição: CENAP	CNPJ: 08.829.974/0015-90

2	Adriano Gambarini	Fotógrafo - registro de atividades	153.635.128-82	17677156 ssp/sp-SP	Brasileira
3	FLAVIO HENRIQUE GUIMARAES RODRIGUES	Co-coordenador	536.695.171-20	1028375 SSP-DF	Brasileira
4	Jean Pierre Santos	Biólogo de campo	013.190.686-00	M7928211 SSP-MG	Brasileira
5	Ricardo Corassa Arrais	Médico Veterinário - campo	311.495.088-41	284103603 ssp-SP	Brasileira
6	Joanes Adenilson May Júnior	Médico Veterinário - análise de dados	910.011.889-34	2539609 ssp-SC	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO ROQUE DE MINAS	MG	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA	UC Federal
2	SACRAMENTO	MG	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA	UC Federal
3	VARGEM BONITA	MG	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA	UC Federal
4	SAO ROQUE DE MINAS	MG	Região rural entre São Roque de Minas, Vargem Bonita, Plumhi	Fora de UC Federal
5	PLUMHI	MG	Região rural entre São Roque de Minas, Vargem Bonita, Plumhi	Fora de UC Federal
6	VARGEM BONITA	MG	Região rural entre São Roque de Minas, Vargem Bonita, Plumhi	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Canepatus, Eira, Galictis, Herpailurus, Nasua, Procyon, Leopardus wiedii, Chrysocyon brachyurus, Leopardus colocolo, Leopardus pardalis, Cerdocyon thous, Leopardus tigrinus, Pseudalopex vetulus, Puma
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Canepatus, Leopardus wiedii, Eira, Galictis, Herpailurus, Nasua, Procyon, Puma, Chrysocyon brachyurus, Leopardus colocolo, Leopardus pardalis, Cerdocyon thous, Leopardus tigrinus, Pseudalopex vetulus
3	Marcação de animais silvestres in situ	Chrysocyon brachyurus
4	Observação e gravação de imagem ou som	Chrysocyon brachyurus

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão, Urina, Ectoparasita, Sangue, Pêlo, Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/ossos/pêlo, Fezes, Sêmen
2	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Carnívoros)	Telemetria via satélite, Rádio transmissor externo, Colar, Brinco

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	CENAP	CENAP - Banco de Amostras Biológicas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 84535288

Página 2/3

Autorização para a utilização das amostras

Ministério do Meio ambiente, MMA

Centro nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros – CENAP

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
DIRETORIA DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE MAMÍFEROS CARNÍVOROS
Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros – CENAP
Estrada Municipal Hisaichi Takabayashi, 8900 – CEP: 12952-011 Bairro da Usina - Atibaia/SP
Telefones: (11) 4416-4346 / 4416-4369 - Fax: (11) 4411-6633 - www.icmbio.gov.br/cenap - cenap@icmbio.gov.br

Atibaia, 8 de Dezembro de 2011

Eu, Rogério Cunha de Paula, chefe substituto do CENAP - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros do ICMBio – Instituto Chico Mendes de Biodiversidade, autorizo o médico veterinário Ricardo Corassa Arrais, aluno de pós graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, a utilizar as amostras biológicas (sangue total, soro e carrapatos) coletados de canídeos domésticos e silvestres e mantidos no CENAP/ICMBio em seu projeto de pesquisa para obtenção do título de Mestre intitulado "Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma spp*, *Babesia spp*, *Ehrlichia spp*, *Hepatozoon spp*, e *Rickettsia spp.*) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil".

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como "Rog C. P.A.".

ROGÉRIO CUNHA DE PAULA
Chefe de Centro de Pesquisa/Substituto

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARRAIS, Ricardo Corassa

Título: Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que lutam pela preservação da biodiversidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que me inspirou a gostar de mato, de bicho, de gente. Obrigado Dna. Janira - *in memorian*, por proporcionar a estrutura pra família ser o que é, cada um do seu jeito, mas todos juntos, sempre. Agradeço à minha mãe Rosa, pelo exemplo de pessoa, profissional, mulher. Sempre me apoiou, permitiu seguir meus sonhos e estar onde estou e continuar seguindo em frente. Tio Marcão, que me ensinou o que é mato e o que é bicho. A todos os primos-irmãos queridos, em ordem alfabética, visto que não há favorecimento: André, Caio, César, Fernanda, Maria Eugênia, Mariana, Rafa, Roger. Meu pai Armando e sua serenidade. Amo vocês.

Agradeço a meu orientador, Marcelo Bahia Labruna, que me aceitou como aluno, mesmo sem experiência com laboratório, me permitiu fazer parte da rotina acadêmica novamente, crescer profissional e pessoalmente, que permitiu meu envolvimento em outros projetos de pesquisa.

Agradeço a família adotiva em São Roque de Minas: Dna. Antônia, Sr. Amadeo, Jaime, Wanilla, Nilvinha, Sal, Sr. Vicente, Dna Nilda, Dna Nilva, Nilvânia. Em especial ao Jean Pierre, grande companheiro, pelas incontáveis horas de armadilhamento, checagem, atolamentos, procedimentos, tombos de moto, churrascos e risadas. Agradeço a todos os proprietários rurais, que sempre abriram suas porteiras pra mim, a muitas Dnas. Marias que me deram café e pão de queijo quando estava com fome, ou mesmo quando não estava. Agradeço à equipe do Projeto Pato Mergulhão, Flávia Pata, Adriano Gambarini, Livia, Soninha, Vanessa, Tico, pelos ótimos momentos de trabalho, lazer, água gelada, bota molhada, sorriso na cara.

Agradeço aos coordenadores do Projeto Lobo da Canastra, Rogério Cunha de Paula, Flávio Rodrigues, Marcelo Bizerril, Ronaldo Morato, que me permitiram fazer parte deste trabalho e por toda a estrutura que me permitiu a coleta e uso das amostras e dados utilizados neste estudo. Agradeço em especial à equipe que esteve ao meu lado durante todo este longo caminho, debaixo de sol e chuva. Fernanda Cavalcanti e Fabiana Lopes Rocha, duas pessoas que me ensinaram muito da vida e com quem continuo aprendendo a cada conversa. Joares May, que me recebeu como estagiário, me ajudou a me tornar veterinário de campo, coordenador de projeto e me ensinou muito. Ao CENAP/ICMBio pela doação das amostras e confiança e parceria durante todos estes anos de campo.

Agradeço a turma do Lab Carrapatos, que me ensinou a rotina de laboratório e sempre atenderam meus pedidos de socorro. Foi um prazer e um privilégio conviver com pessoas inteligentes e dedicadas como vocês, Jonas Moraes, João Fábio, Chico, Felipe, Andréa, Monize, Maria, Mariana, Richard, Danilo, Igor, Julia, Marcos, Gislene. Agradeço a Amália e Herbert, parceiros de PCR, obrigado por todas as dicas e companhia. Agradeço especialmente ao Thiago Martins, que desde a graduação é um grande amigo e incentivador, taxonomista dedicado e eficiente, obrigado parceiro. Agradeço com muito carinho a Arlei e Fernanda por todo o apoio e orientação desde o dia que cheguei ao VPS até o temerário “dia do depósito”. Não sei o que faria sem vocês nesta caminhada. Agradeço ao Prof. Ricardo Dias, que me auxiliou nas análises e interpretações estatísticas e conceitos. Agradeço aos técnicos de laboratório Hilda, Renato e Pedrinho, Sheila, que me ajudou muito com os sequenciamentos e aos demais funcionários do VPS.

Agradeço a outra família adotiva, a de Goiás, pelo carinho que sempre me recebem e o apoio em todos os momentos. Fred, Fer, Mozart, Caio Motta, Mozart, Fred Cigano, Dna. Ana, Sr Nilson, Felipão e Felipinho, Ponêis, Áurea, Cuba, Gordo, Stacie, Ísis. Agradeço muito a Equipe do Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado por ter segurado (e muito bem) as pontas durante este período que estive mais ausente, melhor equipe e melhores amigos que poderia ter.

Agradeço a todos aqueles que em algum momento da vida me ajudaram na trilha do campo, Flávia Miranda, Alexandre MC Lopes, Cátia Dejuste, Cecília Kierulff, Jean Carlos Ramos, Maria Fernanda Marvulo, Danilo Kluyber, Márcio Port Carvalho, que me inspiraram a fazer o que faço e a pegar tudo quanto é bicho, amar o que fazemos, não perder a calma e o bom humor. Admiro muito vocês - um dia chego lá. Agradeço a equipe do zoológico de São Paulo, Rodrigo Pinho, Suzana Hirata, Caio Motta (de novo), todos os PAPs que ajudaram nas campanhas do PCMC.

Agradeço a Alexandra Tiso pela paciência, pelo carinho e compreensão. Amo.

Agradeço a WCS – World Conservation Society, pelo suporte financeiro durante o período de coleta. Agradeço a FAPESP, (processo 2010/03492-3) pelo suporte financeiro durante o mestrado.

RESUMO

ARRAIS, R. C. **Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.** [Occurrence of tick-borne pathogens (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and domestic dogs at Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, Brazil]. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

No período de julho de 2004 a junho de 2012, foram realizadas 104 capturas de lobos-guará. Os animais foram contidos quimicamente para coleta de material biológico. Carrapatos foram encontrados em 94 lobos e enviados ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ-USP, onde foram identificados com auxílio de estereomicroscópio e chaves taxonômicas. Das amostras analisadas, foram encontradas 72 larvas, 188 ninfas e 911 carrapatos adultos, pertencentes às espécies *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma* spp., *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma tigrinum*. O presente trabalho registra pela primeira vez larva de *R. microplus* e adulto de *A. brasiliense* parasitando *C. brachyurus* no país, reforçando os achados prévios da literatura destas espécies de carrapatos utilizarem os lobos-guará como hospedeiros. Sangue e soro também foram coletados durante contenção química, 67 amostras de sangue total de lobos guará e 52 carrapatos adultos foram testados através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a pesquisa de DNA de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. Foi realizada a sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. para 210 amostras de soro de cães domésticos e 43 foram positivas. Quatro indivíduos apresentaram reação homóloga para *R. parkeri*, dois para *R. rhipicephali*, um para *R. rickettsii*. Além disso, foram testadas 88 amostras de soro de lobo guará e, destas, 84 foram positivas para pelo menos uma das espécies de *Rickettsia* e indicaram reação homóloga para *R. parkeri* e *R. rhipicephali*. Foram testadas 84 amostras de soro de lobo-guará na sorologia para *Ehrlichia canis* e, destas, 16 foram positivas. Nos testes moleculares foi detectada e confirmada a presença de *H. canis*, *H. felis*, *R. parkeri* já descritas para

os hospedeiros vertebrados e invertebrados testados no estudo e ainda o primeiro registro em *A. tigrinum* de *Candidatus* R. andeanae e *Candidatus* Midichloria mitochondrii.

Palavras-chave: Carrapatos. Lobo-guará. Anaplasmataceae. Rickettsiales. *Babesia*.

ABSTRACT

ARRAIS, R. C. **Occurrence of tick-borne pathogens (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and domestic dogs at Serra da Canastra National Park, Minas Gerais,. Brazil** [Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil]. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

From July 2004 to June 2012, 104 maned wolves were captured. The animals were chemically restrained in order to collect biological material. Ticks were found in 94 wolves and sent to the Laboratory of Parasitic Diseases FMVZ – USP, and were identified using a stereomicroscope and taxonomic keys. Of the samples analyzed, 72 were larvae, 188 nymphs and 911 adult ticks, from the species *Rhipicephalus microplus* , *Amblyomma* spp , *A. cajennense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma tigrinum* .This paper reports for the first time larvae of *R. b. microplus* and adult of *A. brasiliense* parasitizing *C. brachyurus* in the country, reinforcing the findings in previous studies of these species of ticks using the maned wolves as hosts . Blood and serum samples were also collected during chemical restraint, 67 blood samples of maned wolves and 52 adult ticks were tested using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of DNA of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Rickettsia* spp. Serology was performed for the detection of antibodies to *Rickettsia* spp. 210 serum samples of domestic dogs were tested and 43 were positive. Four individuals showed reaction homologous to *R. parkeri*, two for *R. rhipicephali* and one for *R. rickettsia*. In addition, we tested 88 serum samples of maned wolf and 84 were positive for at least one species of *Rickettsia* and indicated homologous reaction to *R. parkeri* and *R. rhipicephali*. 84 maned wolf serum samples were in serology for *Ehrlichia canis* and 16 were positive. In molecular tests was detected and confirmed the presence of *H. canis*, *H. felis* and *R. parkeri* had already been described for the vertebrate and invertebrate hosts tested in the study. This is also the first report of *Candidatus R. andeanae* and *Candidatus Midichloria mitochondrii* in *A. tigrinum*.

Key-words: Maned wolves. Ticks. Anaplasmataceae. Rickettsiales. *Babesia*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
CID	Coagulação intravascular disseminada
DNA	Deoxyribonucleic acid- ácido dextribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDTA	Ácido etilodiaminotetracético
EM	Ehrliquiose monocítica
EG	Ehrliquiose granulocítica
FMB	Febre Maculosa Brasileira
G	Gramas
<i>g</i>	Força da gravidade
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pb	Pares de Bases
pH	Potencial hidrogeniônico
RMSF	<i>Rocky Mountain Spotted Fever</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNSC	Parque Nacional da Serra da Canastra
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SM	Mamífero silvestre
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unidade
UV	Ultravioleta
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
X	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Lobo guará	19
3.2. Agentes Patogênicos	20
3.2.1. <i>Rickettsia</i> spp.	20
3.2.2 <i>Ehrlichia</i> sp.	24
3.2.3 <i>Anaplasma</i> spp.	26
3.2.4 Candidatus <i>Midichloria mitochondrii</i>	27
3.2.5 <i>Hepatozoon</i> spp.	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Métodos de Campo	31
4.1.1 Área de estudo	31
4.1.2 Coleta de sangue e pesquisa de ectoparasitas em lobos guará	31
4.1.3. Coleta de sangue de cães domésticos	34
4.2 Métodos Laboratoriais.	37
4.2.1 Identificação dos carrapatos	35
4.2.2 Extração de DNA de carrapatos	35
4.2.3 Extração de DNA de sangue	36
4.2.4 Reação de Polimerase em cadeia (PCR)	36
4.2.4.1 Pesquisa de <i>Anaplasma</i> spp.	36
4.2.4.2 Pesquisa de <i>Babesia</i> spp.	37
4.2.4.3 Pesquisa de <i>Ehrlichia</i> spp.	40
4.2.4.4 Pesquisa de <i>Hepatozoon</i> spp.	37
4.2.4.5 Pesquisa de <i>Rickettsia</i> spp. 5.2	38
4.2.4.6 Análise dos produtos PCR	39
4.2.5 SEQUENCIAMENTO	39

4.2.6 Sorologia Para <i>Rickettsia</i> Spp.....	40
4.2.7 Sorologia para <i>Ehrlichia canis</i>	40
4.3 Análise De Dados.....	40
4.3.1 Determinação de área de vida.	41
4.3.2 Análise Filogenética	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Amostragem de lobos-guará e cães.....	43
5.2 Carrapatos em lobos-guará.....	43
5.7 Resultados De Análises Sorológicas.....	44
5.3 Pesquisa de Agentes Patogêncios em Carrapatos.	44
5.4 Pesquisa de Agentes Patogênicos em Lobo-guará.....	45
5.5 Análises Sorológicas	47
5.5.1 Sorologia de cães domésticos para <i>Rickettsia</i> spp.	47
5.5.2 Sorologia de lobos-guará para <i>Rickettsia</i> spp.....	47
5.5.3 Sorologia de lobos-guará para <i>Ehrlichia canis</i>	49
5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
5.8.1 Área de vvida dos lobos-guará.....	50
5.8.2 Determinação de grupos estabelecendo áreas de uso e correlação com os agentes pesquisados	50
6 DISCUSSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas de mamíferos domésticos, silvestres e humanos e podem ser vetores de importância médica na transmissão de doenças, ficando atrás apenas dos mosquitos (PAROLA; RAOULT 2001). Transmitem uma grande variedade de patógenos como fungos, bactérias, vírus e protozoários, sendo por isso considerado importantes vetores na transmissão de doenças infecciosas a humanos na Europa (PAROLA, 2004).

Doenças emergentes transmitidas por carrapatos em humanos e animais domésticos têm ocorrido com frequência nos últimos 30 anos, causadas devido à aproximação do homem às zonas rurais (PAROLA; RAOULT 2001). Muitos dos ciclos de transmissão carrapato - animais silvestres estão consolidados e a doença não é aparente nos hospedeiros naturais. No entanto, surtos podem ocorrer quando carrapatos infectados acabam parasitando hospedeiros acidentais, como cães, gatos e o homem.

Estes ectoparasitos têm despertado o interesse da comunidade científica devido a sua participação na transmissão de doenças de caráter zoonótico como anaplasmose, babesiose, erliquiose, hepatozoonose e riquetsiose tornando-se um crescente problema de saúde pública (FÖLDVARI, 2005; PAROLA, 2005).

Cães domésticos (*Canis familiaris*) são conhecidos reservatórios de patógenos responsáveis pelo declínio de populações de carnívoros silvestres em diversos lugares do mundo (GAYSCONE et al., 1993; ALEXANDER; APPEL, 1994; ROELKE-PARKER, 1996; LAURENSEN et al., 1998). O aumento do contato entre espécies favorece a transmissão de parasitas e, portanto, a emergência de doenças. Adicionalmente, a transmissão de diversos patógenos entre canídeos domésticos e silvestres pode ocorrer através dos carrapatos (DASZAK et al., 2000; LANFRANCHI et al., 2003).

Doenças infecciosas podem ser particularmente importantes para grandes carnívoros, visto que diversas populações já estão seriamente ameaçadas por inúmeros fatores, como destruição de habitat, caça por retaliação à ataque de animais domésticos, caça de suas presas naturais, entre outros (DEEM et al., 2005). Carnívoros são susceptíveis a uma gama de parasitas, muitos deles transmitidos por animais domésticos. (MURRAY et al., 1999).

O risco de morbidade e mortalidade devido às doenças infecciosas é uma preocupação crescente com relação à conservação de espécies silvestres em geral e os lobos-guará têm se mostrado suscetíveis a diversos agentes infecciosos, tais como adenovirose canina, cinomose, parvovirose, raiva, leptospirose, toxoplasmose, hepatozoonose e dirofilariose transmitidos por cães domésticos (DEEM et al., 2005; ANDRÉ et al., 2010).

A região do entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) tem sofrido alta pressão antrópica através da pecuária extensiva e agricultura (IBDF). Os lobos-guará são frequentemente encontrados circulando nas fazendas do entorno, onde são comuns eventos de predação de galinhas (CORRAL, 2007) e encontros agonísticos com cães domésticos (PAULA, 2001). Segundo May-Júnior et al. (2009), lobos amostrados na área do Parque e entorno apresentaram infestação por carrapatos, embora as espécies de carrapato deste estudo não tenham sido identificadas. Estudos anteriores demonstraram que lobos-guará podem ser acometidos por espécies de carrapatos características de cães domésticos, como o *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido popularmente como “carrapato vermelho do cão” (LABRUNA et al., 2005).

Aguire (2009) destaca a necessidade de se realizar pesquisas para elucidar o papel dos canídeos selvagens na epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos. Além disso, estas doenças são de grande importância no que diz respeito à conservação da vida selvagem, na avaliação das interações entre animais domésticos e silvestres e na determinação da importância destes patógenos na saúde pública.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é verificar a ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos em lobos-guará e cães domésticos do Parque Nacional da Serra da Canastra e arredores, Minas Gerais.

2.1 ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de carrapatos infestando lobos-guará capturados no PNSC e arredores;
- Verificar a ocorrência e identificar as espécies de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em lobos guará capturados no PNSC e arredores;
- Sequenciar e posicionar filogeneticamente as amostras positivas obtidas por PCR dos lobos guará capturadas no PNSC e arredores;
- Verificar a ocorrência de *Rickettsia* spp. em cães domésticos e em lobos-guará através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta;
- Verificar a ocorrência de *Ehrlichia* spp. em lobos-guará capturados no PNSC e arredores através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta;
- Correlacionar a ocorrência *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. com as áreas de vida de lobos-guará através do Sistema de Informação Geográfica (SIG).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LOBO GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*)

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815) pertence a um gênero monotípico, sendo o maior canídeo sul-americano, onívoro generalista e de hábitos noturnos. Distribui-se desde a desembocadura do rio Parnaíba no nordeste do Brasil, no sul do Chaco no Paraguai, ao estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e oeste dos Pampas del Heath em Peru. Também tem sido registrado em algumas partes de Argentina e Uruguai (RODDEN et al., 2004)

O lobo-guará habita principalmente o bioma Cerrado, mas têm sido cada vez mais comuns registros em áreas de outros biomas como Pantanal, Floresta Atlântica, áreas de transição do Cerrado com a Caatinga e também em terras cultivadas e pastos. A espécie está listada entre as ameaçadas de extinção no Brasil e está perto de estar ameaçada pela classificação da IUCN (RODDEN et al., 2004), apesar de possuir uma ampla distribuição geográfica (MACHADO et al., 2005).

Atualmente existe um grande número de estudos sobre a espécie, que incluem aspectos de dieta, área de vida, variabilidade genética e doenças, além de descrições gerais da reprodução e comportamento. Porém outros aspectos da ecologia do lobo-guará permanecem com pouca informação disponível, como o referente ao comportamento deste nas paisagens dominadas pelas atividades humanas, assim como ameaças para a conservação da espécie.

A maior ameaça para a conservação do lobo-guará é a redução drástica do ambiente em que vive, sendo que grande parte da sua área de distribuição já se encontra degradada e foi ocupada por empreendimentos agropecuários (FONSECA et al., 1994). O Cerrado é um dos biomas mais ameaçados do Brasil e do mundo. Atualmente apenas cerca de 20% da área do Cerrado encontra-se em estado primitivo (MYERS et al., 2000).

O lobo-guará é um canídeo solitário e territorial, que se junta em casais na época reprodutiva. O tamanho da área ocupada por casais pode variar de $25,21 \pm 4,45 \text{ km}^2$ a $75,03 \pm 34,63 \text{ km}^2$ (DIETZ, 1984; CARVALHO; VASCONCELLOS, 1995;

SILVEIRA, 1999; RODRIGUES, 2002). O casal partilha a mesma área de vida (DIETZ, 1984; RODRIGUES, 2002) e estas áreas podem ser tanto exclusivas, com nenhuma ou pouca sobreposição entre áreas de casais vizinhos (DIETZ, 1984), como as áreas de casais vizinhos podem ter grandes sobreposições (RODRIGUES, 2002).

O requerimento espacial da espécie é alto porque utiliza grandes e exclusivas áreas de vida. Essa característica do lobo-guará o expõe a encontros com humanos e animais domésticos, interação que pode trazer para o lobo problemas relacionados à caça, devido à predação de criações de pequeno e médio porte, doenças (contraídas de animais domésticos), entre outros (RODRIGUES, 2002).

3.2 AGENTES PATOGÊNICOS

3.2.1 *Rickettsia* spp.

O gênero *Rickettsia* compreende organismos intracelulares obrigatórios pertencentes à família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales (RAOUL; ROUX, 1997). Baseado em padrões antigênicos, moleculares e biológicos essas bactérias foram divididas em três grupos: 1) grupo do tifo (GT), representado pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, cujos vetores são insetos (piolhos e pulgas, respectivamente); 2) grupo da febre maculosa (GFM), composto por 23 espécies válidas, e a transmissão associada a carrapatos, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, são transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente. Outras espécies de riquetsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* não estão inseridas em nenhum destes dois grupos, sendo considerado um grupo ancestral (WALKER, 2003).

Em uma classificação mais recente proposta para o gênero *Rickettsia*, baseada em análise multigênica, cinco novos grupos foram descritos: 1) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; 2) grupo da febre maculosa, representado por mais de vinte espécies; 3) grupo de transição, onde

estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; 4) grupo Canadensis, elencado pela espécie *R. canadensis* e ; 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* e ainda vários outros genótipos encontrados em insetos (WEINERT et al., 2009).

Sem dúvida *R. rickettsii* é a mais conhecida e letal das riquetsioses, sobretudo no Brasil. Sua distribuição está restrita às Américas, com registros de casos confirmados no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina. Diferentes espécies de carrapatos são incriminadas como vetor nas diferentes regiões geográficas. Nos EUA as espécies responsáveis pela transmissão são *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e em algumas localidades também por *Rhipicephalus sanguineus*. Na América Latina, o principal vetor é a espécie de carrapato *Amblyomma cajennense*. No México as espécies envolvidas na transmissão de *R. rickettsii*, além de *A. cajennense*, são *R. sanguineus* e *Amblyomma imitator* (LABRUNA et al., 2011).

No Brasil, apesar de *A. cajennense* ser o principal vetor, a espécie de carrapato *Amblyomma aureolatum* é reconhecida também pela transmissão de *R. rickettsii* na região metropolitana da cidade de São Paulo, onde *R. sanguineus* também é implicado como vetor (LABRUNA, 2009).

A bactéria *R. rickettsii* chega a corrente sanguínea através da secreção salivar de carrapatos durante parasitismo, onde infecta células endoteliais do hospedeiro vertebrado, levando à vasculite, necrose vascular e hemorragias com consequente ativação da cascata de coagulação, desencadeando um consumo destes fatores, levando à coagulação intravascular disseminada (CID). Os sinais clínicos iniciam-se com febre, edema e hiperemia hemorragias nos lábios e extremidades, vômitos, diarreia, anorexia, evoluindo para pústulas e alterações neurológicas, sensibilidade dos linfonodos, articulações e músculos (GREENE, 2006). O diagnóstico da Febre Maculosa pode ser feito por métodos sorológicos (HORTA et al., 2007), moleculares (Reação da Cadeia da Polimerase) (KIDD et al., 2008) e isolamento do agente (LABRUNA et al., 2007a).

A febre Maculosa Brasileira (FMB) foi reportada pela primeira vez na década de 1920 e atualmente é considerada uma importante doença reemergente no Brasil (LABRUNA, 2009). Casos humanos já foram notificados nos estados do Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2010). Foram noticiados casos confirmados nos estados de São Paulo (HORTA et al., 2007), Minas Gerais (VIANNA et al., 2008),

Espírito Santo (SEXTON et al., 1993), Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2008) e Santa Catarina (ANGERAMI et al., 2009).

Além de humanos, os cães são susceptíveis à infecção por *R. rickettsii*, com desenvolvimento de febre, anorexia, letargia, depressão, petéquias e equimoses cutâneas, epistaxe, conjuntivite e em alguns casos alterações neurológicas (BREITSCHWERDT et al., 1988; LABRUNA et al., 2009). No Brasil, estudos têm demonstrado que os cães são susceptíveis a *R. rickettsii* brasileira, com desenvolvimento de sinais clínicos (PIRANDA et al., 2008; LABRUNA et al., 2009), sugerindo que esta doença em cães no Brasil possa ser subdiagnosticada. Em pesquisa recente no estado do Espírito Santo, observou-se que 7,6% dos cães e 34,8% dos seres humanos eram soros-positivos para alguma espécie de *Rickettsia* (SPOLIDORIO et al., 2010). Alguns animais silvestres são reservatórios (hospedeiros amplificadores) dessas bactérias, como os roedores silvestres nos Estados Unidos e, capivaras e gambás no Brasil (LABRUNA, 2009).

O aparecimento de novas técnicas moleculares e crescente interesse em zoonoses transmitidas por carrapatos, levaram ao aumento do número de espécies de *Rickettsias* reconhecidos como potenciais agentes patogênicos. A espécie *Rickettsia parkeri*, por exemplo, foi considerada não patogênica por mais de 60 anos (PADDOCK et al., 2004). Diferentemente da infecção por *R. rickettsii*, a infecção por *R. parkeri* é de sintomatologia branda, caracterizada por uma escara no local da picada do carrapato e linfadenopatia regional (PADDOCK, 2005).

R. parkeri já foi relatada em carrapatos *Amblyomma maculatum* em nove estados dos EUA e também no Peru (FORNADEL et al., 2011; FLORES-MENDOZA et al., 2013). Na Argentina e Uruguai foi detectada na espécie *Amblyomma triste* (VENZAL, 2004; NAVA et al., 2008; CICUTTIN; NAVA, 2013) e *Amblyomma tigrinum* na Bolívia (TOMASSONE et al., 2010).

No Brasil, diferentes cepas de *R. parkeri* foram registradas: a amostra COOPERI foi isolada de carrapatos da espécie *A. dubitatum* de Pedreira, estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2004); a amostra NOD foi isolada de carrapatos *Amblyomma nodosum* da região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo (OGRZEWALSKA et al., 2009); uma cepa, até então, idêntica à cepa Maculatum foi isolada de carrapatos *A. triste* (amostra at24) de vida livre de Paulicéia, estado de São Paulo e no estado do Mato Grosso do Sul (SILVEIRA et al., 2007; NIERI-BASTOS et al., 2013); e mais recentemente, uma nova cepa de *R. parkeri*

denominada de amostra Mata Atlântica foi descrita causando doença em humanos nos estados de São Paulo e Bahia (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Posteriormente a mesma cepa foi detectada em carrapatos *A. ovale* no estado de São Paulo por Sabatini et al. (2010) e em *A. aureolatum*, *A. ovale* e *R. sanguineus* em Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011). Além disso, evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri* em cães foram relatadas no Brasil (HORTA et al., 2007; LABRUNA et al., 2007b; SAITO et al., 2008).

No Brasil, até o presente, os únicos casos humanos comprovados de riquetsiose causado por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) no Brasil são de São Paulo (SPOLIDORIO et al., 2010) e da Bahia (SILVA et al., 2011). Ambos os casos foram clinicamente semelhantes, apesar do paciente do caso relatado no Estado da Bahia ter apresentado sintomas mais severos da riquetsiose. Acredita-se que essa nova cepa de *R. parkeri* esteja largamente distribuída por todo o bioma Mata Atlântica e a espécie de carrapato envolvida na transmissão possivelmente seja, primariamente, *Amblyomma ovale* (SZABÓ et al., 2013), com alguma participação secundária de *A. aureolatum* em Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011).

Candidatus Rickettsia andeanae, é uma *Rickettsia* que ainda não foi completamente caracterizada e de acordo com as diretrizes do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriológica, bactérias que não são cultivadas e criopreservadas devem ser classificadas como *Candidatus* (MURRAY; STACKEBRANDT, 1995). *Candidatus R. andeanae* foi descrita inicialmente durante um inquérito epidemiológico após surto de febre no norte do Peru onde ocorreram duas mortes com bactérias do gênero *Rickettsia* como possíveis agentes (BLAIR et al., 2004a). A primeira detecção molecular foi em *A. maculatum*, *Ixodes boliviensis* e *Rhipicephalus sanguineus* coletados de equínos, bovinos e cães no noroeste do Peru (BLAIR et al., 2004b; JIANG et al., 2005; FLORES-MENDOZA et al., 2013). Além disso, os autores constataram a coinfeção deste novo agente com *R. parkeri*, em carrapatos da espécie *A. maculatum* (FORNADEI et al., 2011; FLORES-MENDOZA et al., 2013). Na América do Sul, os registros são para a Argentina em carrapatos das espécies *Amblyomma parvum* e *A. pseudoconcolor* (PACHECO et al., 2007; TOMASSONE et al., 2010b), em *A. triste* no Chile (ABARCA et al., 2012) e *A. parvum* no Brasil (informação verbal)¹.

¹ Informação fornecida Fernanda Nieri-Bastos em 2013.

Os cães domésticos são excelentes sentinelas, já que são susceptíveis à bactérias do gênero *Rickettsia* que podem acometer humanos que estão com frequência expostos a potenciais vetores. (CLEAVELAND et al., 2006). Em canídeos silvestres há relatos sorológicos de infecção por *Rickettsia* em chacais (*Canis aureus syriacus*) em Israel (WANER et al., 1999), coiotes (*Canis latrans*) na Coréia (CAMER; LIM, 2008) e em guaxinins (*Procyon lotor*) nos EUA (BISCHOF; ROGERS, 2005).

3.2.2. *Ehrlichia* spp.

A erliquiose é uma doença causada por uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória (DUMLER et al., 2001) que infecta animais e o homem, de distribuição global, (SKOTARCZAK, 2003). As bactérias do gênero *Ehrlichia*, foram divididas em três genótipos. O genótipo “I” é constituído pelas espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*; genótipo “II” que inclui *E. phagocytophila*, *E. eqüi* e genótipo “III”, que inclui *E. sennetsu* e *E. risticii*, causadoras da erliquiose granulocítica humana (SKOTARCZAK, 2003). No Brasil, são relatadas as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* (ALMOSNY, 1998; MACHADO et al., 2006; LABRUNA et al., 2007b), sendo a *E. canis* de maior prevalência nos cães (ALMOSNY, 1998; TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007a) e detectada frequentemente nos carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (AGUIAR et al., 2007a; SOUZA et al., 2010).

Essas bactérias podem causar duas doenças distintas, a Erliquiose monocítica (EM) e Ehrliquiose granulocítica (EG), acometendo tanto cães quanto humanos (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003). A EG é causada pela *E. phagocytophila* (reclassificada como *Anaplasma phagocytophilum*). 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 humano), transmitida pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma americanum*, respectivamente (SKOTARCZAK, 2003). Esta foi primeiramente descrita no Brasil em 1970, sendo o isolamento obtido somente em 2002 e o principal vetor deste agente no país é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2008a).

No Brasil é considerada uma doença amplamente distribuída (DANTAS-TORRES, 2008a), com alta casuística em cães (41,3%) (LABRUNA et al., 2007b) Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010).

Na América do Sul a erliquiose humana já foi constatada por diagnóstico molecular na Venezuela sendo as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* responsáveis pela infecção (PEREZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2008).e também há evidências sorológicas da circulação de erliquiose na Argentina e no Chile (RIPOLL et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003). No Brasil há relatos de seres humanos positivos em sorodiagnóstico em Minas Gerais (CALIC et al., 2004) e no Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), utilizando-se antígenos de *E. chaffeensis*.

E. canis já foi relatada em estudos sorológicos em canídeos selvagens como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (FISHMAN et al., 2004), que são consideradas possíveis reservatório dessas bactérias nos EUA (GREENE, 2006). *E. chaffeensis* já foi relatada em coiotes nos EUA (KOCAN et al., 2000). Evidências sorológicas da infecção por *Ehrlichia* spp. já foram encontradas em chacais (ALEXANDER, 1994) e coiotes (PARAS et al., 2012). Em estudo envolvendo infecção experimental por *E. chaffeensis*, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) foi susceptível a esse agente, enquanto a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) foi refratária a infecção (DAVIDSON et al., 1999). Outra espécie de *Ehrlichia* que têm como reservatório animais silvestres é a *E. ruminantium* (= *Cowdria ruminantium*) que infeta ruminantes na África (WALKER; OLWAGE, 1987) e que apresenta seqüência gênica de proteínas externas de membrana semelhante a *E. canis*, *E. chaffeensis* e *A. platys* (antiga *E. platys*) (DUMLER et al., 2001). *E. ruminantium* infecta ruminantes silvestres e domésticos na África e nas Ilhas do Caribe (ALLSOPP, 2010), sendo considerada um agente zoonótico, baseado em diagnóstico molecular em casos de óbito por erliquiose (LOUW; ALLSOPP; MEYER, 2005).

Já foi relatada a transmissão por aproximadamente 20 espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente por *A. variegatum* e *A. hebraeum* na África (BARRÉ; UILENBERG, 2010). As espécies de *A. maculatum* e *A. cajennense* demonstraram capacidade de transmissão em condições laboratoriais, mas até hoje não foram implicados como vetores (WALKER; OLWAGE, 1987). O diagnóstico de erliquiose é baseado em esfregaço sanguíneo, citologia corada pelo corante Giemsa, sorologia, cultura de organismos, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008a)

3.2.3 *Anaplasma* spp.

Anaplasmosose é uma doença que acomete animais e humanos 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; BARR; UILENBERG, 2010), *Anaplasma platys* em cães (DANTAS-TORRES, 2008a) e *Anaplasma phagocytophilum* em cães, humanos, gatos e cavalos (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003; GREENE, 2006). *Anaplasma phagocytophilum* (= *Ehrlichia phagocytophila*) é uma bactéria de caráter zoonótico, transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* (WALKER; DUMLER, 1997; OHASHI et al., 2005), infectando neutrófilos e causando a doença conhecida como erliquiose granulocítica (EG) com distribuição principalmente no hemisfério norte (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003), onde a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) é considerada reservatório por apresentar alta frequência de ocorrência de (51%) de animais soros-positivos (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, *A. phagocytophilum* já foi encontrada através da técnica de PCR na Venezuela e no Brasil, onde a anaplasmosose considerada mais importante para cães é a causada pela *A. platys*, amplamente distribuída e geralmente associada a infecções concomitantes com outros patógenos, como *E. canis* e *Babesia canis vogeli*.

O vetor da *A. platys* ainda não está bem elucidado, mas a possibilidade do *Rhipicephalus sanguineus* estar envolvido na transmissão vem sendo estudada (DANTAS-TORRES, 2008a). *A. phagocytophilum* foi relatada em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), na Itália (EBANI et al., 2011) e raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) nos EUA (GABRIEL et al., 2009).

O diagnóstico é realizado por testes sorológicos, cultura celular, PCR ou visualização direta em esfregaço de sangue periférico (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008a).

3.2.4 *Candidatus* Midichloria mitochondrii

Análises filogenéticas baseadas no gene 16S rDNA indicam que as bactérias filogeneticamente semelhantes a *Ca. Midichloria mitochondrii* representam um novo clado que revela uma nova família na ordem Rickettsiales (RODRIGUEZ-EZPELETA; EMBLEY, 2012; MONTAGNA et al., 2013).

Pesquisas realizadas na última década sugerem que *Ca. Midichloria mitochondrii* seja apenas “a ponta do iceberg” no que se refere a um novo grupo de bactérias intracelulares. A linhagem de bactérias filogeneticamente semelhantes à *Ca. Midichloria mitochondrii* estão associadas à diferentes hospedeiros, como carrapatos, pulgas ciliados, amebas, cnidários, esponjas, peixes e humanos (MONTAGNA et al., 2013). A bactéria *Ca. Midichloria mitochondrii* já foi descrita em 12 espécies diferentes de carrapatos ixodídeos (WILLIAMS-NEWKIRK et al., 2012). Na Europa, está associada ao carrapato *Ixodes ricinus*, importante vetor para uma série de doenças na região. Não se conhece o efeito deste parasita em humanos (MARICONTI et al., 2012).

3.2.5 *Babesia* spp.

A babesiose é uma doença mundialmente distribuída, 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). A transmissão é geralmente associada à carrapatos ixodídeos, sendo *Babesia canis canis* transmitida pela espécie *Dermacentor reticulatus*, *Babesia canis rossi* pelo *Haemaphysalis leachi*, e a *Babesia canis vogeli* por *Rhipicephalus sanguineus* (TABOADA; LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009).

Diversas espécies são susceptíveis à infecção por *Babesia* spp. Em humanos pode causar doença febril aguda, frequentemente confundida com malária, e por vezes fatal (ALMOSNY, 2002). No caso dos humanos, a infecção por espécies como

Babesia microti e *Babesia divergens* causam babesiose (TABOADA; LOBETTI, 2006). No Brasil há somente um relato com diagnóstico parasitológico de babesiose humana, porém sem confirmação molecular (ALECRIM et al., 1983).

Em canídeos a espécie responsável pela infecção é *Babesia canis*, que recentemente foi subdividida em três subespécies geneticamente distintas, baseado em análises moleculares: *B. canis canis*; *B. canis rossi*; e *B. canis vogeli* (ALMOSNY, 2002; IRWIN, 2009). No Brasil, a espécie mais prevalente em cães é a *B. vogeli* (PASSOS et al., 2005; TRAPP et al., 2006; COSTA-JÚNIOR et al., 2009). A infecção por *Babesia* spp. já foi relatada em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) na América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2010), cães selvagens africanos (*Lycaon pictus*) (MATJILA et al., 2008). No Brasil há relatos em raposas *Lycalopex vetulus* e *L. gymnocercus* (RUAS et al., 2003), em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (SERRA-FREIRE et al., 1993) e cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (PARAENSE; VIANNA, 1948). Evidências sorológicas já foram detectadas em cachorros do mato e cachorros vinagre (*Speotus venaticus*) de cativeiro (ANDRÉ et al., 2011). Há um relato de um lobo guará também de cativeiro, mantido nos EUA que desenvolveu severa anemia decorrente de babesiose (PHAIR et al., 2012).

A infecção experimental com *Babesia gibsoni* foi realizada em filhotes de coite (*Canis latrans*), que apresentaram mucosas pálidas e esplenomegalia. Um deles apresentou depressão e anorexia. Os sinais clínicos leves, juntamente com o alto nível e longa duração da parasitemia, os coiotes poderiam servir como reservatório (EVERS et al., 2003).

No Brasil, lobo-guará foi reportado com leves alterações hematológicas com exame parasitológico compatível com parasitas do gênero *Babesia* (CANSI et al., 2012).

Até hoje não há diagnóstico molecular de babesiose em canídeos silvestres, usualmente o diagnóstico é feito por visualização microscópica em esfregaço de sangue periférico ou técnicas sorológicas (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; TABOADA; LOBETTI, 2006).

3.2.6 *Hepatozoon* spp.

O gênero *Hepatozoon* compreende mais de 300 espécies de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa (ALMOSNY, 2002; EWING; PANCIERA, 2003) que acometem grande variedade de animais domésticos e silvestres (VICENTJOHNSON; MACINTIRE; BANETH, 2003). A hepatozoonose canina é causada por duas diferentes espécies, *Hepatozoon canis* e *H. americanum* (EWING; PANCIERA, 2003; VICENT-JOHNSON et al., 2003). No Brasil a principal espécie é *Hepatozoon canis* (O'DWYER, 2011).

A infecção ocorre pela ingestão do carrapato contendo oocistos maduros em sua hemocèle (ALMOSNY, 2002; DANTAS-TORRES, 2008a). As espécies de carrapatos associadas à transmissão de *Hepatozoon* no Brasil são: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense* (O'DWYER et al., 2001; FORLANO et al., 2005; RUBINI et al., 2008).

Nos Estados Unidos a hepatozoonose canina é causada pela espécie *Hepatozoon americanum* transmitida pelo carrapato *Amblyomma 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, a fase de merogonia e gamogonia ocorrem 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 a hepatozoonose foi primeiramente relatada em 1970 no estado do Rio de Janeiro (MASSARD, 1979), e recentemente tem sido diagnosticada por análises moleculares e sorológicas em cães do estado de São Paulo (GONDIM et al., 1998; RUBINI et al., 2008), Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2009, 2010), Minas Gerais (MUNDIM et al., 1992; MUNDIM et al., 2008), Rio de Janeiro (FORLANO et al., 2007) e Rio Grande do Sul (MASSARD, 1979). A espécie prevalente no Brasil é *H. canis*, que demonstra baixa patogenicidade nos cães domésticos (RUBINI et al., 2005).

A hepatozoonose acomete cães (PALUDO et al., 2005), gatos (METZGER et al., 2008), e animais silvestres tais como chacais e hienas (CARLTON; MCGAVIN,

1998). Sua manifestação clínica pode variar desde sinais inaparentes (assintomático), principalmente em animais silvestre (RUBINI et al., 2006) quanto à anorexia, diarreia, alterações pulmonar, hipertermia, anemia e apatia ou prostração em animais domésticos (GONDIM et al., 1998; MUNDIM et al., 2008).

Atualmente, hepatozoonoses são comumente diagnosticadas em canídeos silvestres em todo mundo, tais como o cão silvestre africano (*Lycaon pictus*) (MATJILA et al., 2008), raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (GIMENEZ et al., 2009), coioite (*Canis latrans*) (DAVIS et al., 1978; MERCER et al., 1988; KOCAN et al., 1999), chacal de dorso negro (*Canis mesomelas*) (McCULLY et al., 1975).

No Brasil, infecções causadas por *Hepatozoon*, foram diagnosticadas em lobo-guará (*Cerdocyon brachyurus*), raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (ANDRÉ et al., 2010), e no cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) nos estados de São Paulo e Espírito Santo (ALENCAR; KOHAYGAWA; SANTARÉM, 1997; ANDRÉ et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013) e Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

O diagnóstico de hepatozoonose é baseado nos sintomas clínicos, visualização dos gamontes parasitando leucócitos (parasitológico de sangue), biópsia de músculos contendo o parasita em estágio de merogonia, imunohistoquímica, sorologia e PCR (EWING; PANCIERA, 2003; KARAGENC et al., 2006; LI et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS DE CAMPO

4.1.1 Área de estudo

O Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) está situado na região sudoeste do Estado de Minas Gerais, entre 20°00' – 23°00'S e 46°15' - 47°00' W (Figura 1). Foi criado em 1972, pelo Decreto de Lei n.º 70.355, possui uma área total de 2.000 km², contudo apenas uma área de 715 km² vem sendo manejada como Unidade de Conservação de Proteção Integral.

O PNSC se encontra no bioma Cerrado, em uma região de transição com a Mata Atlântica do interior. A atividade econômica primária é a criação de gado, para produção artesanal de queijo (IBDF/FBCN 1981, IBAMA 2004), em pequenas propriedades rurais de 100 hectares ou menos, onde a alteração de habitat é evidente por conta das pastagens exóticas (PAULA, 2002). Os últimos 10 anos foram marcados pelo aumento do turismo regional e a diversificação da economia.

4.1.2 Coleta de sangue e pesquisa de ectoparasitas em lobos-guará

Os lobos-guará foram capturados utilizando 14 armadilhas do tipo Box de desarme independente durante os anos de 2005 e 2012 (Figura 2) Os locais de armadilhamento foram selecionados a partir da presença de vestígios como rastros e fezes, e das observações diretas de lobos. As armadilhas foram iscadas com frango cozido e sardinha, e inspecionadas diariamente.

Figura 1 - Parque nacional da Serra da Canastra - Minas gerais - Brasil

Fonte: IBAMA-MMA, Setembro de 2013.

Os animais foram imobilizados quimicamente com uma aplicação intramuscular de tiletamina-zolazepan (Zoletil® Virbac do Brasi), examinados, marcados com um brinco numerado e equipados com um rádio-colar com tecnologia VHF ou GPS. Durante a avaliação clínica os lobos-guará foram inspecionados quanto à presença de carrapatos. A coleta foi realizada de forma manual e aleatória em relação à região do corpo onde os ectoparasitas forem encontrados. Os carrapatos coletados foram conservados em frascos de vidro herméticos, contendo álcool 70°GL e devidamente identificados.

A coleta de sangue foi realizada através de punção da veia cefálica em tubos Vacutainer® com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante, para obtenção de soro por centrifugação. Uma alíquota de 0,5 ml de sangue total e uma alíquota de 0,5 ml de soro foram fracionadas em criotubos, identificadas, congeladas e trazidas para análise no laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP.

Figura 2. Armadilha do tipo box, de desarme independente.

Lobo guará capturado em armadilha tipo box, antes da contenção química.

Fonte: Rocha, F. L., Junho de 2010

Os procedimentos de captura e manipulação dos animais seguiram as recomendações do guia da Sociedade Americana de Mastozoologia para uso de mamíferos selvagens em pesquisa (GANNON et al., 2007) e do guia de tratamento de animais em pesquisa (ANIMAL BEHAVIOUR, 2006). A captura e coleta de amostras biológicas dos carnívoros selvagens estão licenciadas pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio).

Figura 3. Coleta de carrapatos durante contenção química de lobo guará

Observa-se o parasitismo por *Amblyomma tigrinum* próximo às orelhas, região onde os ectoparasitas são encontrados com frequência.

Fonte: Gambarini, A., Junho de 2013.

4.1.3 Coleta de sangue em cães domésticos

Após autorização dos proprietários, cães domésticos foram submetidos à contenção física, sem necessidade de sedação, para a realização da coleta de sangue, através de punção de veia cefálica em tubos Vacuntainer® com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante, para obtenção de soro por centrifugação. Uma alíquota de 0,5 ml de sangue total e uma alíquota de 0,5 ml de soro foi fracionada em criotubos, identificadas, congeladas e trazidas para análise no laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/USP. Os locais de coleta dos cães domésticos podem ser observados na Figura 8.

Figura 3. Coleta de sangue de cães domésticos.

Contenção física para coleta de sangue de cão através de punção de veia cefálica
Fonte: Rocha, F.L.

4.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

4.2.1. Identificação dos carrapatos

A identificação das espécies dos carrapatos foi realizada nos estágios adultos segundo Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006) e no estágio ninfal segundo Martins (2009). As larvas foram classificadas ao nível de gênero segundo Barros-Battesti et al. (2006).

4.2.2 Extração de DNA de carrapatos

Os carrapatos foram acondicionados em microtubos de 1,5 ml para a extração de DNA conforme previamente descrito por Sangioni et al. (2005).

4.2.3 Extração de DNA de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue de lobo guará foi realizada através do kit comercial Qiagen (DNeasy Tissue and Blood Kit®, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram eluídas em 100 µl de tampão TE.

4.2.4. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As amostras de DNA obtidas de lobo guará foram testadas individualmente para pesquisa de DNA de *Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp, conforme descrito abaixo.

4.2.4.1 Pesquisa de *Anaplasma* spp.

Para a detecção de bactérias da família Anaplasmataceae, cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers* denominados GE2'F2' senso e HE3 anti-senso, que possuem como alvo o gene 16S rDNA e produzem um *amplicon* de 360pb (ANDERSON et al., 1992; BREITSCHWERDT et al., 1988). O protocolo de PCR utilizado foi o mesmo feito por Spolidorio et al. (2009).

4.2.4.2 Pesquisa de *Babesia* spp.

Para detecção do gênero *Babesia* foi realizado uma primeira PCR (BAB1) com os *primers* BAB-33-57 senso e BAB-432-409 anti-senso, correspondentes às regiões conservadas do gene 18S rRNA que produzem um *amplicon* de 370pb, conforme previamente estabelecido (SPOLIDORIO et al., 2009). Para confirmação

das amostras positivas utilizou-se um novo par de primers (BAB-143-167 senso e BAB-694-667) com um *amplicon* de 551pb no mesmo gene alvo 18S rDNA, conforme previamente descrito (ALMEIDA et al., 2013) (Tabela 1).

4.2.4.3 Pesquisa de *Ehrlichia* spp.

Para a detecção de *Ehrlichia* spp, cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers*, DSB-330 senso e DSB-720 anti-senso para o gene *dsb* (DOYLE et al., 2005) Com o objetivo de aumentar a sensibilidade diagnóstica do teste, as amostras foram testadas pela técnica de Nested-PCR para o gene *dsb*, previamente descrito (LABRUNA et al., 2007b) e EHR16SD senso e EHR16SR anti-senso para o gene 16S (INOKUMA;RAOULT; BROUQUI, 2000) conforme descrito por Aguiar et al. (2007a).

4.2.4.4 Pesquisa de *Hepatozoon* spp.

Para detecção de DNA de *Hepatozoon* spp, foram utilizados os *primers* HEP-1mod senso e HEP-4 anti-senso (HEP1), que amplificam um fragmento de cerca de 670- pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp (CRIADO-FORNELIO et al., 2006), conforme protocolo previamente adaptado em nosso laboratório (SPOLIDORIO, 2009). Nas amostras positivas, para melhor caracterização genética do agente, foi realizado nova análise de PCR (HEP2) com novos pares de *primers* denominados HEP-144-169 senso e HEP-743-718 anti-senso (Tabela 1).

4.2.4.5 Pesquisa de *Rickettsia* spp.

Para pesquisa de *Rickettsias*, cada amostra de DNA foi submetida à PCR utilizando-se oligonucleotídeos de alta sensibilidade (“*primers*”) denominados CS-78 senso (“*Forward*”) e CS-323 anti-senso (“*reverse*”), que amplificam um fragmento do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004). As amostras positivas na primeira reação foram submetidas a uma nova reação com um par de *primers* (*Rr190.70*psenso e *Rr190.602*n anti-senso) que amplificam um fragmento de 532pb do gene da proteína externa de membrana 190kDa (*OmpA*), restrito ao grupo da Febre Maculosa (REGNERY; SPRUIL; PLIKAYTIS, 1991).

Quadro 1 *Primers* utilizados na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

<i>primers e gene alvo</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Seqüência dos primers (5' → 3')</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>Referência</i>
<i>gltA</i>	<i>Rickettsia</i>			<i>Labruna et al., 2004</i>
CS-78 CS-323		F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401-pb	
<i>OmpA</i>	Grupo da Febre Maculosa			<i>Regnery et al., 1991</i> <i>Eremeeva et al. 2006</i>
Rr190.70 Rr190.602 Rr 190. 701		ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTGCTCCCCCT GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	532-pb 630-pb	
16S GE2 HE3	Anaplasmataceae	F- GTTAGTGGCAGACGGGTGAGT R- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT	360-pb	<i>Breitschwerdt et al., 1998</i>
18S BAB 33-57 BAB 432-409 BAB2 143-167 BAB2 694-667	<i>Babesia</i>	F- GCCAGTAGTCATATGCTTGCTTAA R- TTCCTTAGATGTGGTAGCCGTTTC F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	370-pb 551-pb	<i>Spolidorio et al., 2009</i> <i>Almeida et al., 2013</i>
18S	<i>Hepatozoon</i>			
HEP2 144-169 HEP2 743-718		F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC R- ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG	574-pb	<i>Almeida et al., 2013</i>
<i>Dsb</i> DSB-330 DSB-720 DSB-380	<i>Ehrlichia</i>	F- GATGATGTTTGAAGATATSAACAAAT R- CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC F- ATTTTITAGRGATTTTCCAATACTTGG	401-pb 349-pb	<i>Doyle et al., 2005</i> <i>Almeida et al., 2013</i>
16S EHR16SD EHR16SR	<i>Ehrlichia</i>	F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC R- TAGCACTCATCGTTTACAG	345-bp	<i>Inokuma et al., 2000</i>

4.2.4.6 Análise dos produtos de PCR

As preparações de DNA (DNA genômico e DNA amplificado por PCR) foram acrescidas de tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5 a 2%) em tampão TBE a 50 V/100 mA. Como marcadores de tamanhos moleculares foram utilizados Ladder 100 bp (MBI Fermentas). Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (0,5 µg/ml) e fotografados em transiluminador de luz U.V.

4.2.5 Sequenciamento

As amostras positivas foram purificadas utilizando-se ExoSAP-IT (USB®Corporation) conforme instruções do fabricante (4 µl de ExoSAP e 10 µl de produto amplificado), e, submetidas ao sequenciamento de DNA utilizando o “Kit Big Dye Terminator 3.1”, de acordo com especificações do fabricante (4µl de DNA purificado – concentração máxima de 100 ng, 1µl de água Mili Q, 0,75 µl de “Big Dye”, 1µl de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/µl), e 3,25 µl de “save money”), em sequenciador automático (Applied Biosystem, Foster,CA), disponível no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ/USP, seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.6 Sorologia para *Rickettsia* spp

Os soros sanguíneos de lobos-guará e cães domésticos foram processados individualmente pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (CAMARGO, 1964) utilizando-se antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. bellii*, cultivados pelo laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva e Saúde animal da FMVZ-USP, foi realizada seguindo a metodologia descrita segundo Horta et al. (2004).

Os soros reativos na diluição 64 para qualquer espécie de *Rickettsia* foram testados em diluições seriadas (64, 128, 256, 512, 1024, 2048...) para determinação do título final de reatividade. A amostra que demonstrou para uma determinada espécie de *Rickettsia* um título quatro vezes maior que a outra espécie testada, foi considerada homóloga para a primeira espécie de rickettsia, conforme padrões previamente definidos (HORTA et al., 2004).

4.2.7 Sorologia para *Ehrlichia canis*

A RIFI utilizando antígeno de *Ehrlichia canis* isolado em células DH82 e também cultivado em nosso laboratório foi aplicada às amostras de lobo guará, seguindo os métodos descritos por Aguiar et al. (2007b) utilizando conjugado anti-IgG total de cão doméstico. O valor de corte determinado foi 1/80.

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Foram considerados positivos os animais nos quais a presença do DNA do parasita foi detectada por análise molecular ou quando foram identificados anticorpos contra o parasita na análise sorológica, porém as análises foram realizadas separadamente para cada metodologia. Os animais foram considerados livres de contato e/ou infecção nos casos em que os exames sorológicos e moleculares foram negativos. A ocorrência das infecções foi obtida através da divisão do número de amostras positivas pelo número de indivíduos amostrados. Cada animal amostrado, inclusive recapturas, foi considerado como indivíduos independentes nas análises estatísticas. A ocorrência de cada patógeno testado foi comparada entre e área de vida dos lobos-guará, usando testes qui-quadrado (χ^2) e o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

As frequências de positividade por patógenos transmitidos por carrapatos serão confrontados com o tipo de área de uso com o intuito de estabelecer relações

significativas entre os parasitos em questão e o contato com ambientes silvestres ou domésticos (propriedades rurais com animais domésticos).

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no programa SPSS 9.0. O nível de significância (p) para todas as análises foi de 5%.

4.3.1 Determinação de área de vida

Treze lobos guará foram equipados com colares radiotransmissores VHF (164-166 MHz), para a realização do monitoramento, obtendo triangulações em solo sem bases fixas, percorrendo estradas internas e externas do PNSC. Cada triangulação foi obtida a partir de dois ou mais ângulos coletados em diferentes pontos. Cinco lobos guará foram equipados com colares GPS, que armazenam coordenadas geográficas, eliminando a necessidade de se realizar as triangulações por terra e fornece localizações mais confiáveis e precisas que os colares VHF.

Para os animais com colares de VHF, as localizações foram obtidas utilizando-se o Programa LOAS (Location Of A Signal / Ecological Software Solutions, Inc.) e as mesmas foram plotadas em um mapa do PNSC. Utilizando-se o Programa Arc View 3.2 e uma de suas extensões (Animal Movement), as áreas de vida foram então estimadas pelo método do Mínimo Polígono Convexo (MPC). O método do MPC utiliza todas as localizações do animal para desenhar o menor polígono convexo possível, assumindo assim que os animais usam todas as partes de sua área de forma igual. O critério adotado para a determinação da área de uso dos lobos guará foi baseado na relação entre o MPC e a linha limítrofe do parque.

4.3.2 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) (SWOFFORD et al., 1996). 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 Poit Replacer v. 2.0 (<http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>).

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAGEM DE LOBOS GUARÁ E CÃES

Entre 2005 e 2012 obteve-se um esforço de captura de 640 armadilhas/noite por ano amostrado e foram realizadas 104 capturas de lobos guará, sendo 50 diferentes indivíduos e 54 recapturas. Foram coletados carrapatos de 94 indivíduos e 10 não apresentaram ectoparasitos. Amostras de sangue de 67 indivíduos e amostras sorológicas de 87 indivíduos foram coletadas. Devido à dificuldade de obtenção de amostras por condições adversas dos animais no momento da contenção química, não possível a obtenção de material biológico de todos os lobos guará capturados. Além disso, foram amostrados 210 cães das propriedades rurais adjacentes ao PNSC (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de indivíduos e amostras biológicas obtidas

	Sangue Total/*	Soros/*	Carrapatos/*
Lobo-guará	67/37	87/47	94/104
Cães	-	210/210	-
Total	67/37	297/257	94/104

* número total de indivíduos amostrados para cada material biológico

5.2 Carrapatos em lobos-guará

Foram colhidos e identificados 1206 carrapatos, sendo 72 larvas, 189 ninfas e 945 carrapatos adultos sobre lobos guará (N=104), de acordo com Tabela 2. Dos 104 lobos guará capturados e examinados, 90,3% (94) estavam parasitados por carrapatos. Carrapatos adultos representaram 78,36% dos carrapatos coletados, enquanto larvas e ninfas representaram 21,64%.

Tabela 2 - Identificação dos carrapatos coletados em lobos guará.

Espécie	Machos	Fêmeas	Ninfas	Larva	TOTAL
<i>A. cajennense</i>	3	8	189		271
<i>A. tigrinum</i>	638	294	0		932
<i>A. ovale</i>	0	1	0		1
<i>A. brasiliense</i>	0	1	0		1
<i>Amblyomma</i> sp.	0	0	0	71	71
<i>R. b. microplus.</i>	0	0	0	1	1
TOTAL	641	304	189	72	1206

5.3 PESQUISA DE AGENTES PATOGÊNICOS EM CARRAPATOS

Foram analisados 52 espécimes de *A. tigrinum* para a pesquisa de patógenos. Destes, 39 carrapatos foram coletados em 13 lobos diferentes e processados em “pools” contendo três machos. Os demais 23 *A. tigrinum* foram coletados de um único lobo guará, mantidos vivos e testados individualmente.

Das 52 amostras testadas, sete (13,5%) foram positivas para *Hepatozoon* sp. e posicionadas nas análises filogenéticas com *H. canis* com altos valores de suporte no ramo (85% de bootstrap) (Figura 4). Já para *Rickettsia*, dos 52 carrapatos colhidos, 11 carrapatos (21,2%) foram positivos, para os genes de citrato sintase e ompA, sendo três amostras similares com *R. parkeri* (99-100%) e oito amostras com *Candidatus R. andeanae* (99-100%). Para a família Anaplasmataceae, dos 52 espécimes testados, 19,2% (N=10) foram positivos e o posicionamento filogenético evidenciou a segregação das amostras obtidas de *A. tigrinum* em dois diferentes clados de *Candidatus Midichloria mitochondrii* (Figura 5)

Nenhum dos carrapatos testados foi positivo para bactérias do gênero *Ehrlichia* e protozoários do gênero *Babesia*. (Tabela 3)

5.4 PESQUISA DE AGENTES PATOGÊNICOS EM LOBO GUARÁ

Foram testadas 67 amostras de sangue total de lobos guará e todas foram negativas para a família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia* e *Rickettsia*. Entretanto, 56,7% (38) dos carrapatos foram positivos para *Hepatozoon* sp. e segregados em *H. canis* e *H. felis* (Figura 4) e 43,3% (29) foram positivos para o gênero *Babesia*. Porém, as duas sequencias obtidas através dos produtos gerados para o gene 18S rDNA de *Babesia* apresentaram altas similaridades com a espécie *Hepatozoon felis*. (Tabela 4).

Figura 4. Árvore filogenética, de *Hepatozoon*, baseada no gene 18S rDNA pelo método de Máxima Parcimônia (MP)

Árvore filogenética baseada no gene 18S rDNA pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 12 sequencias de *Hepatozoon* e *B. canis* como grupo externo (466 caracteres, 55 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas.

Tabela 3 Número de amostras positivas na técnica da PCR, de amostras de sangue total e carrapatos de lobos guará, para os agentes patogênicos testados e valores de similaridade encontrados no GenBank

Amostra biológica	<i>Hepatozoon</i>	Similaridade BLAST	<i>Babesia</i>	Similaridade BLAST	Anaplasmataceae	Similaridade BLAST	<i>Rickettsia</i>	Similaridade BLAST
Sangue total	38 (56,7)	(99-100%) <i>H. felis</i> ((99-100%) <i>H. canis</i>	29 (43,3)	(99-100%) <i>H. canis</i>	0 (0)		0 (0)	
Carrapatos	7 (13,5)	(99-100%) <i>H. canis</i>	0 (0)		10 (19,2)	(99-100%) <i>Ca. M. mitochondrii</i>	11 (21,2)	(99-100%) <i>R. parkeri</i> (99-100%) <i>Ca. R. andeanae</i>

5.5 ANÁLISES SOROLÓGICAS

5.5.1 SOROLOGIA DE CÃES DOMÉSTICOS PARA *RICKETTSIA* SPP.

Foram testadas 210 amostras de soro de cão doméstico, destas 43 (20,4%) foram positivas no teste de triagem para ao menos uma espécie de *Rickettsia* e então encaminhadas para titulação. Na titulação, 27 amostras foram positivas para *R. rickettsii*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024, 30 positivas para *R. parkeri*, com títulos variando entre 1/64 e 1/12048, 21 positivas para *R. rhipicephali*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024, 20 positivas para *R. amblyommii*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024 e 6 positivas para *R. belli*, com títulos variando entre 1/64 e 1/256. A frequência de títulos obtidos nas análises sorológicas pode ser observada na Tabela 4.

5.5.2 SOROLOGIA DE LOBOS GUARÁ PARA *RICKETTSIA* SPP.

Foram testadas 87 amostras de soro de lobo guará, destas, 84 (oitenta e quatro) foram positivas no teste de triagem para ao menos uma espécie de *Rickettsia* e então encaminhadas para a titulação. Na titulação, 57 amostras foram positivas para *R. rickettsii*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024, 68 positivas para *R. parkeri*, com títulos variando entre 1/128 e 1/32768, 57 positivas para *R. rhipicephali*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024, 57 positivas para *R. amblyommii*, com títulos variando entre 1/64 e 1/1024 e 6 positivas para *R. belli*, com títulos variando entre 1/64 e 1/256. As frequências de titulações obtidas nas análises sorológicas podem ser observadas na Tabela 7 e Tabela 8.

Figura 5.- Árvore filogenética de “Ca Midichloria mitochondrii” de diferentes espécies de carrapatos baseada no gene 16S rDNA pelo método de Máxima Parcimônia (MP)

Árvore filogenética baseada no gene 16S rDNA pelo método de Máxima Parcimônia (MP) em 25 sequências de “Ca Midichloria mitochondrii” de diferentes espécies de carrapatos e *A. phagocytophilum* como grupo externo (310 caracteres, 39 caracteres informativos). Números dos nós correspondem ao valor de suporte (Bootstrap) de 500 replicatas

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Setembro, 2013.

Tabela 4 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para cinco espécies de *Rickettsia* na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.

Animal	Nº testados	Nº de amostras reativas para cada espécie de <i>Rickettsia</i> (% soropositividade)					Número de animais com reação homóloga determinada (espécie em parênteses) ⁺
		<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia amblyommi</i>	<i>Rickettsia rhipicephali</i>	<i>Rickettsia bellii</i>	
Lobos	87	68 (78,1)	57 (65,5)	57 (65,5)	57 (65,5)	8 (9)	17 (16 <i>R. parkeri</i> , 1 <i>R. rhipicephali</i>)
Cães	210	30 (14,2)	27 (12,8)	20 (9,5)	21 (10)	6 (2)	7 (4 <i>R. parkeri</i> , 2 <i>R. rhipicephali</i> , 1 <i>R. rickettsii</i>)
Total	297	98 (32,9)	84 (28,2)	77 (25,9)	68 (22,8)	14 (4,7)	24 (20 <i>R. parkeri</i> , 3 <i>R. rhipicephali</i> , 1 <i>R. rickettsii</i>)

⁺ A reação homóloga foi determinada quando a titulação mais alta encontrada foi no mínimo quatro vezes maior do que a encontrada para outra espécie de *Rickettsia*. Neste caso a espécie de *Rickettsia* determinada foi considerada como a possível responsável pela infecção.

Tabela 5 - Titulações referentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Rickettsia parkeri* na região do Parque Nacional Da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.

Animais	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192	16,384	32,768	Total
Lobos	1	3	7	15	32	2	3	0	3	2	68
Cães	1	5	7	6	9	2	0	0	0	0	30
Total	2	8	14	21	41	4	3	0	3	2	98

5.5.3 Sorologia de lobos-guará para *Ehrlichia canis*

Foram testadas 87 amostras de soro de lobo guará, destas, 16 (18,2%) foram consideradas positivas na análise sorológica. As titulações variaram de 1/160 a 1/34560.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.8.1 Área De Vida Dos Lobos Guará

Foram analisadas as localizações de 20 lobos guará, sendo cinco equipados com colares GPS e os 15 restantes com colares VHF. As áreas de vida correspondentes a cada indivíduo podem ser observadas na figura 6

5.8.2 Determinação De Grupos Estabelecendo Área De Uso E Correlação Com Os Agentes Pesquisados.

Baseado na análise das áreas de vida dos lobos guará (Figura 6) foram formados 4 grupos diferentes, sendo: Grupo 1, composto por animais cuja área de uso é exclusivamente no interior do PNSC; Grupo 2, composto por animais cuja área de uso é parcialmente no interior do PNSC com sobreposição com o Grupo 1; Grupo 3, composto por animais cuja área de uso é parcialmente no interior do PNSC e não há sobreposição com o Grupo 1 e o Grupo 4 composto por animais cuja área de uso é exclusivamente fora do PNSC. As análises estatísticas de correlação entre patógenos e os lobos guará foram baseadas nos grupamentos formados e descritos acima sobre a área de vida dos animais.

Para estas análises foram utilizadas apenas as amostras de lobos guará monitorados, excluindo as amostras de animais que foram apenas capturados e soltos sem acompanhamento posterior. Dos 104 indivíduos capturados 18 (38,3%) foram monitorados e utilizados para esta análise e representam 59,1% dos indivíduos testados nas análises sorológicas e moleculares.

Figura 6 – Áreas de vida de lobos guará na região do Parque Nacional da Serra da Canastra e amostras de sangue de cães domésticos utilizadas neste estudo.

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

Dentre os agentes pesquisados, não houve diferença estatística entre a positividade para a família Anaplasmataceae e *Babesia* spp. Entretanto, os animais positivos para *Hepatozoon* spp. observou-se diferença estatística significativa ($p < 0.05$). Nenhum dos lobos analisados do grupo 4 foi positivo, enquanto 84,6% dos do grupo 1, 71,4 % dos do grupo 3 e 54,5 % dos do grupo 2 foram positivos para *Hepatozoon* spp.

Para riquetsioses, nos lobos do grupo 1, observou-se distribuição normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. rickettsii* e *R. amblyommi* ($p > 0,05$) e distribuição diferente da normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *R. beli* ($p < 0,05$). Nos lobos do grupo 2, observou-se distribuição normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommi* e *R. rhipicephali* ($p > 0,05$) e distribuição diferente da normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. beli* ($p < 0,05$). Nos lobos do grupo 3 observou-se distribuição normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. rickettsii*, *R. amblyommi*, e *R. rhipicephali* ($p > 0,05$) e distribuição diferente da

normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. parkeri* ($p < 0,05$). Nos lobos do grupo 4, observou-se distribuição normal para resultados de diluições da RIFI para: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommi*, *R. rhipicephali* e *R. beli* ($p > 0,05$).

Foi utilizado o teste de Kilmogorov-Smirnov para a verificação das diferenças das diluições entre grupos na próxima fase, pois, para as mesmas análises, há grupos que apresentaram distribuições normais e diferentes da normal. Neste caso, testes não paramétricos são os mais apropriados. Os resultados apontaram que não há diferenças entre grupos ao comparar as diluições da RIFI, somente para *R. rhipicephali*. A próxima análise (*post-hoc*) foi utilizada para identificar qual(is) grupo(s) diferem, dois a dois, somente para este agente. Estes resultados indicaram que há diferença significativa entre as diluições da RIFI entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,007$), sendo que o grupo 1 apresentou os maiores valores, e entre os grupos 2 e 3 ($p = 0,035$), sendo que o grupo 3 apresentou os maiores valores. Não há diferença significativa entre as diluições da RIFI entre os grupos 2 e 4 ($p = 0,769$), 1 e 3 ($p = 1,000$), 1 e 4 ($p = 0,192$) e 3 e 4 ($p = 0,296$). Para erliquiose não foi possível realizar a análise, pois somente um lobo monitorado foi positivo para *Ehrlichia canis* na sorologia.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho obteve grande sucesso de captura de lobos guará no Parque Nacional da Serra da Canastra quando comparado a estudo conduzido na mesma área por Dietz (1984). Esse autor, em dois anos de estudo, com esforço de 1537 armadilhas/noite, conseguiu capturar oito lobos. O autor, apesar de ter pesquisado vários aspectos relativos à ecologia, e sanidade, não foi analisado nenhum agente veiculado por carrapatos.

Canídeos silvestres podem ser infestados por diversas espécies de carrapatos, sendo os mais comuns *Amblyomma aureolatum*, *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. parvum* (LABRUNA et al., 2005). A espécie de carrapato encontrada com maior frequência em lobo guará neste estudo foi *Amblyomma tigrinum* todos em estágio adulto. Formas imaturas (ninfas) de *A. cajennense* foram as mais prevalentes, corroborando estudos prévios (LABRUNA et al., 2005).

As formas imaturas de *A. tigrinum* estão relacionadas a hospedeiros como aves e roedores (LABRUNA et al., 2005, ESTRADA-PEÑA, 2005), enquanto adultos parasitam carnívoros domésticos e silvestres (NAVA et al., 2006) No Brasil, *A. tigrinum* é considerada uma das principais espécies que parasitam carnívoros silvestres, particularmente no bioma cerrado, com registro em quatis (*Nasua nasua*), onças pintadas (*Panthera onca*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), raposas do campo (*Lycalopex vetulus*) e lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) (ARAGÃO, 1936 WHITAKER; DIETZ, 1987; LABRUNA et al., 2005; BECHARA et al., 2005; CURI et. al., 2010). A presença desta espécie parasitando lobos guará corrobora estudos prévios que indicam membros da ordem Carnivora como prováveis hospedeiros primários para *Amblyomma tigrinum* (LABRUNA et al., 2002). A diferença encontrada, neste estudo, com relação à quantidade de carrapatos adultos, larvas e ninfas coletadas não representa obrigatoriamente maior quantidade de adultos em parasitismo, mas reflete a dificuldade de encontrar estágios imaturos nos animais farmacologicamente contidos.

A espécie *Amblyomma ovale* apresenta ampla distribuição na América do Sul e no Brasil, junto com *A. tigrinum*, é considerada uma das principais espécies, no estágio adulto, a parasitar carnívoros no cerrado e roedores em estágios imaturos. (LABRUNA et al., 2005). Porém, foi coletado um único lobo guará infestado com esta espécie de carrapato e que utiliza a área externa do PNSC, com fitofisionomia distinta das demais áreas do interior do Parque apresentando ambiente característico de *A. ovale*, enquanto no interior do Parque nota-se um ambiente mais seco, campos limpos, cerrado e campos de altitude. Carrapatos da espécie *Amblyomma ovale* já foram relatados parasitando carnívoros selvagens no Brasil, como os jaguarundis (*Puma yagouaroundi*), onças pardas (*Puma concolor*), furões (*Galictis cuja*), mãos pelada (*Procyon cancrivorus*) cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), raposas (*Pseudalopex gymnocercus*) e lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*). (ARAGÃO, 1936; WHITAKER AND DIETZ, 1987; GUGLIELMONE et al, 2003; LABRUNA et al., 2005).

No presente estudo foi colhido um único espécime adulto da espécie *A. brasiliense* em lobo guará. Ninfas de carrapatos da espécie *Amblyomma brasiliense* já foram relatadas no Brasil parasitando onças pintadas (*Panthera onca*) e lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*). Contudo, este é o primeiro registro de adultos parasitando carnívoros selvagens. Em condições naturais, a queixada (*Tayassu* spp) é considerada o principal hospedeiro de *A. brasiliense* (Aragão, 1936; Guimarães et. al., 2001), embora exista carência de informações relacionadas à biologia deste carrapato (SANCHES et al.,2008). É importante destacar que larvas e ninfas de *A. brasiliense* estão entre os carrapatos mais agressivos para humanos no Brasil (Aragão 1936). O parasitismo de ninfa e adultos de *A. brasiliense* em humanos foi relatado no estado de São Paulo (Szabó et al., 2006).

Todas as ninfas coletadas foram identificadas como *Amblyomma cajennense*. Essa espécie está amplamente distribuída pela América e parasitando diversos hospedeiros, sendo que o parasitismo em carnívoros já foi registrado em quatis (*Nasua nasua*), onças pintadas (*Panthera onca*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), gatos do mato (*Leopardus tigrinus*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), raposas do campo (*Lycalopex vetulus*) cachorros vinagre (*Speothos vinaticus*) e lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) (LABRUNA et al., 2005, BECHARA et al., 2005).

Além das espécies de *Amblyomma* colhidas, uma larva de *Rhipicephalus boophilus microplus* foi encontrada parasitando um lobo guará com área de vida exclusiva fora do Parque. Os bovinos são os hospedeiros primários de todos os estágios do carrapato *Rhipicephalus boophilus microplus*, portanto, o parasitismo em lobos guará indica o compartilhamento de habitat. No Brasil, há relatos de ninfas de *Rhipicephalus boophilus microplus* parasitando onças pintadas (*Panthera onca*), gatos do mato (*Leopardus tigrinus*) e lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) (LABRUNA et al., 2005), porém este é o primeiro registro de larva de *Rhipicephalus boophilus microplus* parasitando lobo guará.

Não foi possível quantificar e classificar a infestação devido à falta de padronização na coleta dos carrapatos durante as capturas. O fato dos carrapatos identificados neste estudo terem sido coletados de animais de vida livre, vivos e em diferentes estações pode explicar o maior número de carrapatos em comparação com outros estudos realizados com hospedeiros mortos, devido ao fato de não haver o desprendimento natural após óbito. (ALMEIDA et al., 2013).

Destaca-se a ausência de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, parasitando os lobos guará neste estudo. Esta espécie já foi relatada parasitando carnívoros como gatos do mato (*Leopardus wiedii*), lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) no Brasil. O *R. sanguineus* ou “carrapato vermelho do cão”, como é conhecido, está geralmente associado à cães em áreas urbanas. Apesar do grande número de cães presente no entorno do PNSC, as características ambientais podem não favorecer os carrapatos desta espécie. A maioria dos cães que vivem ao redor do PNSC não recebe tratamento antiparasitário, porém o hábito de não ter um local específico para dormir durante a noite (hábito de ninho) dificulta o hábito nidícola dessa espécie de carrapato. A coleta de carrapatos de cães não foi objetivo deste estudo, porém recomenda-se a realização de novas colheitas para a melhor compreensão sobre a biologia dos carrapatos que ocorrem na região.

Os carrapatos são ectoparasitas de uma grande variedade de vertebrados, incluindo o homem e podem ser vetores de importância médica na transmissão de doenças, ficando atrás apenas dos mosquitos (PAROLA; RAOULT 2001). Transmitem uma grande variedade de patógenos como fungos, bactérias, vírus e protozoários, sendo por isso considerados importantes vetores na transmissão de doenças infecciosas (PAROLA, 2004).

No presente estudo foram detectados agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, nas amostras de sangue total e de carrapatos colhidos de lobos guará, dos gêneros *Rickettsia*, *Hepatozoon* e da família Anaplasmataceae.

Com relação ao gênero *Rickettsia*, o presente trabalho indica a presença e circulação de duas espécies de *Rickettsia* na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, em lobos guará: *Candidatus Rickettsia andeanae* e *R. parkeri*, ambas do grupo da febre maculosa, detectadas na espécie de carrapato *Amblyomma tigrinum*.

Embora, nenhuma das amostras de sangue de lobos guará testadas tenha sido positiva para *Rickettsia* spp, esse fato já era esperado, pois a detecção de DNA riquetsial só é possível durante o período de riquetsemia, que dura poucos dias (BURGDORFER et al., 1988), portanto é considerado um evento raro (HORTA et al., 2007). Além disso, *Rickettsia* spp. infecta células endoteliais e a concentração do parasita no sangue é baixa. Por outro lado, uma baixa sensibilidade da PCR pode explicar a não detecção do agente no sangue, dado que auxiliaria na discriminação entre infecções ativas ou infecções prévias, baseadas em resultados sorológicos.

No Brasil as espécies de carrapatos relatadas como responsáveis pela transmissão de Rickettsias são *Amblyomma cajennense* e *A. aureolatum* (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006). *R. parkeri* já foi relatada em *A. triste*, no Uruguai (VENZAL et al., 2004; PACHECO, et al 2006), no Brasil (SILVEIRA et al., 2007; NIERI-BASTOS et al., 2013), Argentina (NAVA et al., 2008; CICUTTIN; NAVA, 2013) Chile (ABARCA et al., 2012), em *A. maculatum* nos EUA (FORNADEL et al., 2011; JIANG et al., 2012) em *A. nodosum*, no Brasil (OGRZEWALSKA et al, 2009). Em *A. tigrinum*, *R. parkeri*, foi registrada na Bolívia (TOMASSONE et al., 2010). Portanto, este é o primeiro relato de *A. tigrinum* infectado por *R. parkeri* no Brasil. A possibilidade do *Amblyomma tigrinum* ser vetor para riquetsias deve ser investigada, visto que este e outros estudos indicam esta espécie como possível parte do ciclo de transmissão de *R. parkeri*. Estes resultados são particularmente importantes para a saúde pública, já que há relatos que adultos de *A. tigrinum* também parasitando humanos (GUGLIELMONE et ai. 2006).

Com relação a *Ca Rickettsia andeanae*, o presente trabalho relata pela primeira vez essa espécie infectando *A. tigrinum*. Estudos relatam a presença de *Ca Rickettsia andeanae* em diferentes espécies de carrapatos, incluindo *Amblyomma maculatum*, *Ixodes boliviensis*, e *Rhipicephalus sanguineus* no Peru (BLAIR et al., 2004, FLORES-MENDOZA et al., 2013); *A. maculatum* nos Estados Unidos (JIANG et al., 2012), *A. parvum* e *Amblyomma pseudoconcolor* na Argentina (Pacheco et al., 2007, TOMASSONE et al., 2010), *Amblyomma triste* no Chile (ABARCA et al., 2012); e em *A. parvum* no Brasil (NIERI-BASTOS et al., no prelo).

Para os representantes da família Anaplasmataceae, no presente estudo não foi detectada a presença de endossimbiontes no sangue dos lobos guará, mas foi detectada e confirmada a presença de *Candidatus Midichloria mitochondrii* em carrapatos da espécie *Amblyomma tigrinum*. Este é o primeiro relato deste endossimbionte em *A. tigrinum* e também no Brasil. Estudos demonstram uma menor associação destes endossimbiontes com carrapatos machos (LO et al., 2006), corroborando a baixa porcentagem encontrada nos machos testados de *A. tigrinum*.

Os endossimbiontes obrigatórios são importantes para a sobrevivência dos seus hospedeiros e são transmitidos verticalmente (CLAY et al., 2006; PEARLMAN et al., 2006). *Coxiella*-like, *Franscisella*-like e *Rickettsia*-like são os principais endossimbiontes bacterianos em carrapatos (HAYDES and BURGDORFER 1981; NODA et al., 1997; SUN et al., 2000). *Rickettsia*-like simbioses são importantes na fisiologia dos carrapatos, na dinâmica de populações e transmissão de outras espécies patogênicas da mesma família (CHILDS AND PADDOCK, 2002). *Candidatus Midichloria mitochondrii* foi inicialmente descrita em *Ixodes ricinus* e são endossimbiontes das mitocôndrias dos carrapatos (SASSERA et al., 2006). Atualmente estes endossimbiontes são descritos em diversas espécies dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* (WILLIAMS-NEWKIRK et al., 2012).

Não é conhecida a patogenicidade destes endossimbiontes para hospedeiros vertebrados, porém estudos recentes apontam a presença de anticorpos Anti-*Midichloria mitochondrii* no sangue de mamíferos silvestres e humanos, sem sintomatologia clínica, sugerindo a presença destes anticorpos como indicadores de picadas de carrapatos (MARICONTI et al., 2012).

O posicionamento filogenético das sequências obtidas de *A. tigrinum* em dois diferentes clados pode indicar a transferência vertical múltipla dos endossimbiontes nesta espécie de carrapato em diferentes épocas, como sugerido para *A. americanum* que possui três diferentes genótipos de *Midichloria mitochondrii* (WILLIAMS-NEWKIRK et al., 2012). Além disso, o posicionamento de um maior número de sequências deste endossimbionte provenientes de diversas espécies de carrapatos poderá evidenciar processos de coevolução entre os endossimbiontes e seus hospedeiros, como descrito para endossimbiontes *Coxiella*-like (ALMEIDA et al., 2012).

Infecções múltiplas de endossimbiontes e outros patógenos em carrapatos indicam uma menor capacidade de transmissão dos agentes patogênicos quando os carrapatos são primariamente infectados com os endossimbiontes (MIRA and MORAN 2002; MACALUSO et al., 2002). As relações da endossimbiose com os hospedeiros carrapatos ainda são poucos investigadas, mas a presença de *Borrelia burgdorferi* em *I. ricinus* aumentam a tolerância desta espécie de carrapatos a ambientes secos e quentes (HERRMANN and GERN et al., 2010) e a presença de *Midichloria mitochondrii* na mesma espécie de carrapato está associado ao mecanismo energético mitocondrial dos carrapatos (PISTONE et al., 2012). Tais fatores podem explicar a associação do endossimbionte com *A. americanum* e o aumento de sua distribuição geográfica nos Estados Unidos (WILLIAMS-NEWKIRK et al., 2012). *Amblyomma tigrinum* é uma espécie associada a ambientes abertos e quentes (GUGLIELMONE et. al, 2000) e a simbiose com *Midichloria mitochondrii* pode favorecer a adaptação dos carrapatos neste tipo de ambiente. Além disso, processo crescente de desmatamento de áreas florestadas com substituição por áreas de pastagens pode propiciar a presença e forrageio de lobos guará (PAULA et al., 2008) e subsequentemente o aumento da distribuição de *Amblyomma tigrinum* e sua potencial vetoração de patógenos.

No presente estudo foi encontrada alta positividade para parasitas do gênero *Babesia*, mas todas as sequências obtidas através dos amplificadores, gerados pelos primers específicos, apresentaram alta similaridade (99 a 100%) com *Hepatozoon canis* quando comparados as sequências depositadas no GenBank. Uma das hipóteses para esse fato é a baixa especificidade do diagnóstico utilizado para a babesiose canina, demonstrando a necessidade do sequenciamento de DNA para o diagnóstico das amostras. O achado de alta taxa de prevalência de positivos nos

cães pode refletir a ocorrência somente de *Hepatozoon* corroborando os achados em canídeos silvestres capturados no estado de Minas Gerais onde não houve ocorrência de hemoparasitas do gênero *Babesia* (CURI et al., 2010).

As espécies de *Babesia*, principalmente *B. canis*, são responsáveis por quadros febris e hemolíticos com subsequente anemia e hemoglobinúria (BICALHO et al., 2002) e é um agente amplamente distribuído no Brasil, com frequência diagnosticado em cães domésticos. Estudo realizado com lobos guará capturados no Parque Nacional da Serra do Cipó, também em Minas Gerais, não detectou *Babesia* spp. em nenhum dos três lobos guará, nove cachorros do mato e duas raposas do campo testadas. (CURI et al., 2010). Por outro lado, um único relato de positividade baseou-se em exames parasitológicos com a pesquisa em esfregaços sanguíneos (MARTINS et al., 2006, SERRA-FREIRE et al., 1993; RUAS et al., 2003, GUEDES et al., 2011). A detecção por técnicas moleculares só foi relatada em raposas vermelhas, no Canadá. (BIRKENHEUER et al., 2010).

A ausência de infecção por *Babesia* pode ser sustentada pelo fato de que o carrapato transmissor deste hemoprotozoário no Brasil, o *Rhipicephalus sanguineus* (TABOADA, 2006, IRWIN, 2009), carrapato característico de ambientes urbanos, não ser encontrado parasitando nenhum lobo guará (LABRUNA et al., 2005).

No presente estudo não foram detectadas amostras positivas para *Ehrlichia* spp. através de técnicas moleculares, somente através de técnicas sorológicas, onde 17 amostras apresentaram título. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é considerada o teste padrão para *Ehrlichia canis*. Embora o ponto de corte adotado neste estudo seja o mesmo utilizado para cães, a leitura dos resultados tende a ser subjetiva e podem ocorrer reações cruzadas entre diferentes espécies de *Ehrlichia* (BÉLANGER et al., 2002). Até o momento, não existe padronização de testes sorológicos para *E. canis* de carnívoros silvestres, portanto, um ponto de corte apropriado é ainda desconhecido (ORTUNO et al., 2005).

Títulos baixos podem ser explicados por uma resposta imune humoral anti-*E. canis* não relevante para lobos guará ou reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* (ORTUNO et al., 2005). Embora a maioria das amostras sororeagentes encontradas tenham apresentado baixos títulos de anticorpos anti-*E. canis*, duas amostras apresentaram título de 1/34560, considerado alto. Em estudo realizado com coiotes nos Estados Unidos, 5,2% dos animais foram positivos sorologicamente (PARAS et al., 2012), na Suíça, 44% das raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*)

testadas também foram positivas em região onde não ocorre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (PUSTERLA et. al., 1999), nos EUA, 21,7% dos guaxinins testados foram positivos na sorologia (DUGAN et. al., 2005). Na Itália nenhuma das 150 raposas testadas foi positiva em testes moleculares, o autor sugere que a ausência da infecção na região pode estar relacionada ausência do carrapato *R. sanguineus* na região. (EBANI et. al. 2011). A porcentagem de positividade em diversas regiões do mundo com diferentes espécies de carnívoros demonstra que espécies que habitam o peridomicílio (raposas vermelhas e guaxinins) estão mais susceptíveis ao contato com carrapatos vetores (*Rhipicephalus sanguineus*) e o agente. Os achados deste estudo são inconclusivos, pois somente um lobo sorologicamente positivo foi monitorado. Porém, este único indivíduo monitorado e positivo para *E. canis* pertence ao grupo 3 cuja área de vida inclui parcialmente a área do PNSC reforçando os achados com outros grupos de carnívoros silvestres.

A detecção molecular e sorológica de *Hepatozoon* infectando canídeos silvestres já foi relatada nas Américas, Europa, Ásia, e África e Brasil (ALMOSNY, 2002, ALMEIDA, 2013). No Brasil, há relatos em cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), (ALENCAR; KOHAYGAWA; SANTARÉM, 1997; ALMEIDA, 2013), porém a taxa de infecção encontrada neste estudo foi maior que a observada em outros canídeos silvestres (GIMENEZ et al., 2009; ANDRÉ et al., 2010, ALMEIDA, 2010, HORNOK et. al., 2013), e semelhante à a prevalência em cachorros do mato (ALMEIDA et al., 2012) e em cães domésticos no país (KARAGENC et al., 2006; RUBINI et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010).

A alta ocorrência para *Hepatozoon* neste estudo demonstra a ampla distribuição deste agente na população de lobos guará da região do PNSC, provavelmente deve estar associada à presença do carrapato *Amblyomma tigrinum*, visto que 13,5% dos carrapatos desta espécie testados foram positivos para *Hepatozoon* spp. Além disso, somente 12 dos lobos analisados não estavam sendo parasitados por esta espécie de carrapato. A transmissão da hepatozoonose se dá pela ingestão do carrapato infectado (DANTAS-TORRES, 2008a), que no lobo guará, pode ocorrer através da predação de pequenos animais como aves e roedores, (que são os mais comuns hospedeiros de larvas e ninfas de *A. tigrinum*) ou durante comportamento de auto-limpeza ("grooming"). A infecção experimental de cães já foi realizada através da ingestão de *A. ovale* positivos (FORLANO et. al, 2005). Transmissão vertical de *Hepatozoon* spp. já foi descrita em cães (MURATA

et. al, 1993), porém este fato não explicaria a alta prevalência encontrada, possivelmente outra espécie de carrapato deve estar envolvida na transmissão na região.

O posicionamento filogenético evidenciou a presença de dois genótipos, *Hepatozoon* Lobo guará 1 agrupado com *H. felis*, associado a carnívoros e preferencialmente em felinos (SMITH, 1996). A presença desta espécie de *Hepatozoon* em lobos guará está fortemente associada a espécie de carrapato *A. tigrinum* que pode parasitar qualquer espécie de carnívoro (GUGLIOMONE et al., 2005). O genótipo *Hepatozoon* Lobo guará 2 foi agrupado com *H. canis* que trata-se de uma espécie fortemente associada a cães domésticos e que pode infectar gatos domésticos (SALAKIJ et al., 2008). Outros estudos baseados em análises moleculares e posicionamento filogenético detectaram a presença desta mesma espécie de patógeno em Cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) (ALMEIDA et al., 2012). A principal via de transmissão destes agentes é através da ingestão de carrapatos, porém é descrita também a infecção oral por predação de pequenos roedores (JOHNSON et al., 2009). A fauna de pequenos mamíferos terrestres compreendem as principais presas de lobo guará e hospedeiros de formas imaturas de *A. tigrinum*.

Estes resultados demonstram a susceptibilidade desse canídeo à infecção por *Hepatozoon* sp e sugerem que, como relatado em algumas espécies de animais, o lobo guará possa agir como reservatório do agente sem manifestações clínicas, o que é com frequência observado em animais silvestres (METZGER et al., 2008), e podem significar uma adaptação desses animais a este agente.

A análise da área de vida dos lobos guará evidenciou a associação de algumas das doenças estudadas com estas áreas, os grupos de lobos que vivem somente dentro da área do PNSC estão mais associados a infecção por *Hepatozoon* do que aqueles que vivem somente nas áreas externas do parque. Este fato pode estar associado ao maior contato das populações que vivem na área do PNSC aos principais agentes transmissores para os lobos guará (*A. tigrinum*).

Atualmente a conservação da vida silvestre deve relacionar diversos aspectos de cada espécie estudada, como biologia, comportamento, meio ambiente e susceptibilidade das populações a agentes patogênicos. Até o final da década passada não havia estudos sobre a sanidade das populações de lobos guará no Brasil e outros países que englobam sua ocorrência. A diminuição de áreas naturais

e o gradual contato de populações silvestres com animais domésticos possibilita o intercambio de patógenos que podem levar a graves processos de diminuição das espécies silvestres que já estão seriamente ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the First Tick-Borne Rickettsia in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 2012.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. 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, 2007a.
- AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802. 2007b.
- AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil; **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489-493, 2008
- AGUIRRE, A. A. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. 2 p. 1–8, 2009.
- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V. A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 279-282, 1997.
- ALEXANDER, K. A.; APPEL, M. J. G. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 481–485, 1994.
- ALEXANDER, K. A.; KAT, P. W.; WAYNE, R. K.; FULLER, T. K. Serologic Survey of Selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, n. 30, p. 486–491, 1994.
- ALLSOPP, B. A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 123-135, 2010.
- 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 Hepatozoons Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, n. 3, v. 50, 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.

ANDERSON, R.C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission.** Wallingford, UK , 1992, 651p.

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.

ANGERAMI, R. N.; SILVA, A. R. M.; NASCIMENTO, E. E. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; SANTOS, F. C. P.; MANCINI, D. M.; OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; SILVA, J. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. **Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 15, v. 2, p. 207-208, 2009.

ANIMAL BEHAVIOUR Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. **Animal Behaviour**, v. 71, p. 245-253, 2006.

ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE 1998. Guidelines for Capture, Handling, and Care of Mammals as Approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy*, 78: 1416-1431.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular and Serological Detection of *Babesia* spp. in Neotropical and Exotic Carnivores in Brazilian Zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 1, p. 139-143, 2011.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, p. 115-130, 1961.

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, G.H.; **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo, SP, 2006, 223 p.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; DUARTE, J.M.B.; MATUSHIMA, E.R.; CAMPOS PEREIRA, M.; RECHAV, Y.; KEIRANS, J.E.; FIELDEN, L.J. Ticks Associated with Wild Animals in the Nhecolândia Pantanal, Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 289-297, 2005.

BLAIR, P.J.; JIANG, J.; SCHOELER, G.B.; MORON, C. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 42, p. 4961–4967, 2004a.

BLAIR, P. J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAY, A. Evidence of rickettsial and leptospira infections in Andean Northern Peru. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 70, p. 357–363, 2004b.

BICALHO, K.A, PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, . 5, p. 546-548, 2002.

BISCHOF, R.; ROGERS, D. G. Serologic Survey of Select Infectious Diseases in Coyotes and Raccoons in Nebraska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 787–791, 2005.

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. 34, p.179-182, 2010.

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELER, J. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P. SUMMER, J. W. RICHARDS, AL L. OLSON, J. G. Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. **Journal Of Clinical Microbiology**, n. 42, v. 11, p. 4961-4967, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa Nº 3, de 27 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Distrito Federal, 27 de maio de 2003, seção 1, p. 88-97.

BRASIL. **Febre Maculosa, descrição e situação epidemiológica**. Secretaria do Estado da Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555>. Acesso em: 30 jul. 2013.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTIS, B. C.; ALLEN, D. A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 70-76, 1988.

BURGDORFER, W., LANE, Spirochetes in mammals and ticks (Acari: Ixodidae) from a focus of Lyme Borreliosis in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 1 p. 1-9, 1988.

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, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis for toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, n. 3, p. 117-118, 1964.

CAMER, G. A.; LIM, C. W. Detection of spotted fever and typhus group rickettsial infection in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) in Chonbuk Province, Korea. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 2, p. 145-147, 2008.

CANSI, E. R.; BONORINO, R.; MUSTAFA, V. S.; GUEDES, K. M. R. Multiple parasitism in wild maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Mammalia: Canidae) in Central Brazil. **Compared Clinical Pathology**, v.21, p. 489–493, 2011.

CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. São Paulo: Artmed, 1998. 672p.

CARVALHO, C. T.; VASCONCELLOS, L. E. M. Disease, food and reproduction of the maned wolf - *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Carnivora, Canidae) in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 627-640, 1995.

CHILDS, J. E.; PADDOCK, C. D. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 307-337, 2003.

CICUTTIN, G.; NAVA, S. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 123-125, 2013.

CHILDS, J. E.; PADDOCK, C. D.; Passive surveillance as an instrument to identify risk factor for fatal Rocky Mountain spotted fever: is there more to learn? *Merican Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, p. 450-457, 2002

CLAY, K.; FUQUA, C.; LIVELY, C.; WADE, M.; Microbial community ecology of tick-borne human pathogens. In: COLLINGE S, RAY C. **Disease Ecology**. Oxford, 2006. p. 41-57.

CLEAVELAND, S.; MESLIN, F. X.; BREIMAN, R. Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. **Nature**, v. 440, p. 605, 2006.

CORRAL, L. **Avaliação da predação de criações domésticas por lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG, Brasil**. 2007, 83 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Faculdade de Biologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

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.; BARBACARRETERO, J.C. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 93-99, 2006.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; ZAHLER-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, p. 257-260, 2009.

CURI, N. H. A.; ARAÚJO, A. S.; CAMPOS, F. S.; LOBATO, Z. P.; GENNARI, S. M.; MARVULO, M F. V.; SILVA, J. C. R.; TALAMONI, S. A. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. **Biodiversity Conservation**, v. 19, p. 3513-3524, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 197–203, 2006.

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

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.173-185, 2008b.

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

DASZAK, P.A.; CUNNINGHAM, A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.

DAVIDSON, W. R.; LOCKHART, J. M.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W. Susceptibility of red and gray foxes to infection by *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 696–702, 1999.

DEEM, S. L.; EMMONS, L. H. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, p. 192–197, 2005.

DIETZ, J. M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 392, p. 1-50, 1984.

DUGAN, V.G.; GAYDOS, J. K.; STALLKNECHT, D. E.; LITTLE, S. E.; BEALL, A. D.; MEAD, D. G.; HURD, C. C.; DAVIDSON, W. R. Detection of *Ehrlichia* spp. in Raccoons (*Procyon lotor*) from Georgia **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, n. 2, v. 5, p. 162-172, 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.

EBANI, V. V.; VERIN, R.; FRATINI, F. POLI, A. CERRIL, D. Molecular Survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 3, p. 699-703, 2011.

ESTRADA-PENÃ, A.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; CAFRUNE, M. M.; GUGLIELMONE, A. A. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. **Systematic Parasitology**, v. 60, p. 99–112, 2005.

EWING, S. A.; PANCIERA, R. J. American canine Hepatozoonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 4, v. 16, p. 688-697, 2003.

EVERS, H. V.; KOCAN, A. A.; REICHARD, M. V.; MEINKOT, J. H.; Experimental *Babesia gibsoni* infection in coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 4, p. 904-908, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap, **Evolution**, v. 39, n 4, p. 783-791, 1985.

FLORES-MENDOZA, C.; FLORIN, D.; FELICES, V.; GRAF, P. C. F.; BURRUS, R. G.; RICHARDS, A. L. First reported detection of *Rickettsia parkeri* from within Peru and the first reported presence of *Candidatus Rickettsia andeanae* in the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 7, p. 505-508, 2013.

FÖLDVÁRI, G. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 125-131, 2005.

FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; COSTA, C. M. R.; MACHADO, R. B. E.; LEITE, Y. L. R. **Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção**, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1994.

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.

FORNADEL C, M.; ZHANG, X.; SMITH, J. D.; PADDOCK, C. D.; CHRISTOPHER D. PADDOCK, ARIAS, J. R.; NORRIS, D. E. High Rates of *Rickettsia parkeri* Infection in Gulf Coast Ticks (*Amblyomma maculatum*) and Identification of “Candidatus *Rickettsia Andeanae*” from Fairfax County, Virginia. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1535-1539, 2011.

GALVÃO, M. A. M. **Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco periurbano**. 1996. 114 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, Minas Gerais, 1996.

GANNON, W. L.; SIKES, R. S.; ANIMAL CARE AND USE COMITEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild animals in research. **Journal of Mammalogy**, v. 88, p. 809-823, 2007.

GAYSCONE, S. C.; LAURENSEN, S.; LELO, L.; BORNER, M. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. **Journal of Wildlife Disease**, n. 29, p. 396–402, 1993.

GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, A.; MIGUEL, F. A.; DOMINGUEZ-PENAFIEL, 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.

GREENE, C. E.; **Infectious diseases of dog and cat**. Georgia, USA, 2006, 1397 p.

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

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; LUCIANI, C. E.; VIÑABAL, A. E. *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central-northern Argentina with notes on hosts and seasonal distribution. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 983–989, 2000.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÃ, A.; KEIRANS, J. E.; & ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. Houten, **The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases**. 2003.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS- ATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUNÃ, D.; ESTRADA-PENÃ, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83–100, 2006.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 841-845, 2005.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo, 2001. 213 p.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2006. 1387 p.

HAYES, S. F.; BURDORFER, W. Ultrastructural comparisons of *Wolbachia*-like symbiote of ticks (Acari:Ixodidae). In: BURDORFER, W.; ANACKER, A. L. **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**. New York, 1997. p. 281-333.

HERRMANN, C.; GERN, L. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 1196-1204, 2010.

HORNOK, S.; TÁNCZOS, B.; MERA, I. F. G.; FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; FARKAS, R. High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, n. 196, p. 189-193, 2013.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-Endemic area in the State of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71: p. 93-97. 2004.

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. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Parque Nacional da Serra da Canastra - Revisão do Plano de Manejo**. Brasília, Distrito Federal. 2004.

IBDF **Plano de Manejo: Parque Nacional da Serra da Canastra..** Brasília, Distrito Federal. 96p, 1981.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite & Vectors**, v. 2, p. 4, 2009.

JIANG, J.; BLAIR, P. J.; FELICES, V.; MORON, C.; CESPEDES, M.; ANAYA, E.; SCHOELER, G. B.; SUMNER, J. W.; OLSON, J. G.; RICHARDS, AL. L. Phylogenetic Analysis of a Novel Molecular Isolate of Spotted Fever Group Rickettsiae from Northern Peru – *Candidatus Rickettsia andeanae*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n, 1063, p. 337-342, 2005.

JIANG, J.; STROMDAHL, E.; RICHARDS, A. L.; Detection of *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Gulf Coast Ticks Collected from humans in the United States **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 3, p. 175-182, 2012.

JOHNSON, E. M.; ALLEN, K. E.; PANCIERA, R. J.; LITTLE, S. E.; EWING, S. A. Infectivity of Hepatozoon americanum cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 148-150, 2008.

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.

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.

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.

KOCAN, A.; LEVESQUE, G. C.; WHITWORTH, L. C.; MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; BARKER, R. W. Naturally Occurring *Ehrlichia chaffeensis* Infection in Coyotes from Oklahoma. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 477-480, 2000.

LABRUNA, M. B.; JORGE R. S. P.; SANA, D.A.; JÁCOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. JR.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, .A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; GOMES, A. A. B.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C. R.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F. V.; MORATO, R. L. G.; ALHO, C. J. R.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149-163, 2005.

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.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of Rickettsia infection in dogs

from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 249-255, 2007b.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America **Rickettsiology and rickettsial Diseases Fifth annual conference – Annals of the New York Academy of Sciences** 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.

LAMAS, C. C. **Soroprevalência de Bartonella spp, Coxiella burnetii, rickettsia do grupo da febre maculosa e hantavírus em indivíduos HIV positivos em Jacarepaguá, Rio de Janeiro**. 2008. 139 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Biomédicas – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; LEMOS, E. R. S. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian Spotted Fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 149-151, 2008.

LANFRANCHI, P.; FERROGLIO, E.; POGLAYEN, G.; GUBERTI, V. Wildlife veterinarian, conservation and public health. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 567–574, 2003.

LAURENSEN, K.; SILLERO-ZUBIRI, C.; THOMPSON, H.; SHIFERAW, H.F.; THIRGOOD, S. & MALCOLM, J. Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. **Animal Conservation**, v. 1, p. 273–280, 1998.

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.

LION, M.B. **Diversidade genética e conservação do Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), em áreas protegidas do distrito federal**. 2007 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Biologia, Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 2007.

LO, N.; BENIATTI, T.; SASSERA, D. Widespread distribution and high prevalence of na alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1280-1287, 2006.

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.

LOUW, M.; ALLSOPP, M. T. E. P.; MEYER, E. C. *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. **South African medical journal**, v. 95, n. 12, p. 948-950, 2005.

LUCE-FEDROW, A.; WRIGHT, C.; GAFF, H. D.; SONESHINE, D. E.; HYNES, W. L. RICHARDS, A. L. *In vitro* propagation of *Candidatus Rickettsia andeanae* isolated from *Amblyomma maculatum*. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, p. 74-81, 2012.

MACALUSO, K. R.; SONESHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia* **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 809-813, 2002.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, E. G. M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes de dados**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005, 157 p.

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.

MARICONTI; EPIS, A.; GAIBANI, P.; VALLE, C. D.; SASSERA, D.; TOMAO, P.; FABBI, M.; CASTELLI, F.; MARONE, P.; SOMBRI, V.; BAZZOCCHI, C. BANDI, C. Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are positive to *Midichloria mitochondrii*: is *Midichloria* a novel pathogen or just a marker of tick bite? **Pathogens and global health**, v. 7, n. 106, p. 391-996, 2012.

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 do Congresso da Sociedade paulista de Zoológicos, 2006, p15.

MARTINS, T. F. **Descrição e redescrição morfológica do estágio ninfal e chave taxonômica para ninfas de carrapatos do gênero Amblyomma (Acari: Ixodidae) que ocorrem no Brasil**. 2009. 101f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

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.

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.

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) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1979.

MAY-JR, J. A.; SONGSASEN, N.; AZEVEDO, F. C.; SANTOS, J. P.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, F. H. G.; RODDEN, M. D.; WILDT, D. E.; MORATO, R. G. Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p 81-90, 2009.

McCULLY, R. .; 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.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, M. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MERCER, S. H.; JONES, L. P.; RAPPOLE, J. H.; TWEDT, D.; LAACK, L. L.; CRAIG, T. M. *Hepatozoon* sp. In Wild Carnivores in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 3, p. 574-576, 1988.

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.

MIRA, A.; MORAN, N. A. estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted symbiont bacteria. **Microbiological Ecology**, v. 44, p. 137-143, 2002.

MOTTA-JUNIOR, J. C. 1997. Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae). **Anais de Ecologia**, v. 15, p. 197-209.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

MURRAY, D. L.; KAPKE, C. A.; EVERMANN, J.; FULLER, T. K. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. **Animal Conservation**, v. 2, p. 241-254, 1999.

MURATA, T.; INOUE, M.; TATEYAMA, S.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 55, p. 867–868, 1993.

MURRAY, R. G.; STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 186–187, 1995.

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.

NAVA, S., ELSHENAWY, Y., E. EREMEEVA, M. E., SUMNER, J. W., MASTROPAOLO, M., PADDOCK, C.D. *Rickettsia parkeri* in Argentina, **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n.12, p. 1884-1897, 2008.

NICHOLAS,K.B.; NICHOLAS-JR, H.B. **GeneDoc**: Analysis and Visualization of Genetic Variation, 1997.]

NODA, H.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J.; Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolffbachia* spp and tick-borne pathogens of humans and animals. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3926-3932, 1997.

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.

O'DWYER, L. H.; Brazilian canine Hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 181-193, 2011.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the Tropical Medicine Parasitology**, v. 103, p. 413–425, 2009.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L, J.; LABRUNA, M. B.; *Rickettsia parkeri* in Uruguay **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1804-1805, 2006.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 805-811, 2004.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a Paradigm for Multiple Causes of Tick-Borne Spotted Fever in the Western Hemisphere. **Annals of the New York Science Academy**, v. 1063, p. 315-326, 2005.

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 Reserach**, 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.

PARAS, K. L.; LITTLE, S. E.; RICHARD, S. E.; REICHARD, MASON, V.; REISKIND, M. V. Detection of *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia* Species in Coyotes (*Canis latrans*), from Rural Oklahoma and Texas **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 12, p. 619-621, 2012.

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.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 18, p. 719-756, 2005.

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

PAULA, R.C. Interação entre canídeos silvestres e domésticos na região de entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra. (Resumo) *In*: CADERNO DE RESUMOS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA, 1, 2001, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Anais do congresso brasileiro de mastozoologia, Porto Alegre, 2001, p. 34.

PAULA, R.C. **Impact of Anthropogenic Activities on the Mammal Diversity in the Cerrado Ecosystem of Brazil**. 2002, f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Biologia, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida, EUA, 2002.

PAULA, R. C.; MÉDICI, P.; MORATO, R. G.; **Plano de ação para a conservação do Lobo-guará**, Atibaia, 2008. 160f.

PEARLMAN, S. J.; HUNTER, M. S.; ZCHORI-FEIN, E. The emerging diversity of Rickettsia **Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences**, v. 273, p. 2097-2106, 2006.

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.

PHAIR, K. A.; CARPENTER, J. W.; SMEE, N. MYERS, C. N.; POHLMAN, L. M. Severe Anemia Caused by Babesiosis in a Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 1, p. 162-167, 2012.

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

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

PUSTERLA, N.; SEPLAZES, P.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Serological Evidence of Infection with *Ehrlichia* spp. in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 4, n. 37, 1168-1169, 1999.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, 9 694-719, 1997.

REGNERY, R. L.; SPRUIL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **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.3 50-354, 1999.

ROELKE-PARKER, M. E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEAVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, J.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G. L. ; MGASA, M. N.; MACHANGE, G. A.; SUMMERS, B. A; & APPEL, J. G. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions. **Nature**, v. 379, p. 441–445, 1996.

RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. In: Sillero-Zubiri C., Hoffman M. and MacDonald D. W. (editores). Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. **Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*)** Gland, Switzerland and Cambridge, 2004, p. 38-43.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF**. Dissertação (Doutorado em Ecologia) - Faculdade de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.

RODRIÍGUEZ-EZPELETA, N.; EMBLEY, M. T.; The SAR11 Group of Alpha-Proteobacteria Is Not Related to the Origin of Mitochondria. **PLoS ONE**, n. 7, v. 1, 2012.

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.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 47, p. 913–916. 2010.

SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; NARKKONG, N. A.; SIRINARUMITR, T.; PATTANARANGSAN, R. Hematologic, cytochemical, ultrastructural, and molecular findings of Hepatozoon-infected flat-headed cats (*Prionailurus planiceps*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 31-41, 2008.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACEHCO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSSON, C. E. & LABRUNA, M. B. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **American journal of Tropical Medicine e Hygiene**, v. 79, p. 102-108, 2008.

SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; GARCIA, M. V.; LABRUNA, M. B. SZABÓ, M. J. P. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 44, n. 1, p. 43-48, 2008.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M. SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SASSERA, D.; BENIATI, T.; BANDI, C.; BOUMAN, E. A. P.; SACCHI, L.; FABBI, M.; LO, N. 'Candidatus Midichloria mitochondrii' na endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 56, p. 2535-2540, 2006

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 Zoológicos, 1993, São Paulo. Anais do Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, São Paulo, São Paulo, 1993. p. 161.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; DUMLER S.; WALKER, D. H.; PEÇANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, p. 222-226, 1993.

SKOTARCZAK, B. Canine Ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 10, n. 2, p. 137-141, 2003.

SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D. Rabies and mortality of Ethiopian wolves (*Canis simensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, p. 80–86, 1996.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S.; KO, I. O. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n. 2, 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infection Diseases** v. 13, p. 1111–1113, 2007.

SILVEIRA, L. **Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás**. 1999. 177 f. Dissertação (Mestrado em ecologia) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiás. 1999.

SMITH, T.G.; The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of the American Society of Parasitologists**, v. 82, n. 4, p. 565-568, 1996.

SONESHINE, D. E.; LANE, R. S.; NICHOLSON, W. L. Ticks (Ixodidae). *In*: MULLEN, G.; DURDEN, L. **Medical and Veterinary Entomology**, New York, New York, 1995, p. 517-558.

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

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.

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.

SUN, L. V.; SCOLES, G. A.; FISH, D.; O'NEIL, S. L. *Francisella*-like endosymbionts of ticks. **Journal of Invertebrates Pathology**, v. 76, p. 301-303, 2000.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; GARCIA, M.V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; CASTRO, M.B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental Applied Acarology**, v. 39, p. 339–346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, n. 3, p. 1-9, 2013a.

SZABÓ, M. P.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719-728, 2013b.

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

TESOURO, M. A.; BACELLAR, F.; SAINZ, A.; FILIPE, A. Persistence of Antibodies to *Rickettsia conorii* in Dogs. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 441-443, 1998.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; DE-MENEGHI, D. *Rickettsia* Infection in Dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 953-958, 2010.

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, L.; CEBALLOS, L. A.; GURTNER, R. E. KITRON, U.; FARBER, M. Detection of "Candidatus *Rickettsia* sp. strain Argentina" and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v. 52, p. 93-100, 2010.

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.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; PORTILLO, A.; MANGOLD, A. J.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIZ, M. L. PÉREZ-MARTÍNEZ, L. SANTIBÁÑEZ, S. OTEO, J. A. Detection of Alpha and Gamma-Proteobacteria in *Amblyomma triste* from Uruguay, **Experimental Applied Acarology**, v. 44, p. 49-56, 2008.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

VIANNA, M. C. B.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial Spotted Fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 297-301, 2008.

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

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, D. H.; DUMLER, S. Human Monocytic and Granulocytic Ehrlichioses. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 121, p. 785-791, 1997.

WALKER, D. H.; VALBUENA, G. A.; OLANO, J. P. Pathogenic Mechanisms of Diseases Caused by Rickettsia. **Annals of the New York Academy of Science**, n. 990, p. 1–11, 2003.

WANER, T. A.; BANETHB, B.; STRENGERA, C.; KEYSARYA, C.; KINGC, R.; HARRUSB, S. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, n. 82, p. 121-128, 1999.

WEINERT, L. A., WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M.. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, V15

WHITAKER, J. R.; DIETZ, J.M. Ectoparasites and other associates of some mammals from Minas Gerais, Brazil. **Entomology News**, v. 98, p. 189-197, 1987.

WILLIAMS-NEWKIRK, A.; ROWE, L. A.; MIXSON-HAYDEN, R. T.; DASCH, G. A.; Presence, genetic, variability, and potential significance of “Candidatus *Midichloria mitochondrii*” in the lone star tick *Amblyomma americanum* **Experimental applied acarology**, v. 58, p. 291-300, 2012.

WOODROFFE, R.; CLEAVELAND, S.; COURTENAY, O.; LAURENSEN, K.; ARTOIS, M. **The African wild dog: Status, survey and conservation action plan**. IUCN/SSC, 1997, 182p.