ALINY PONTES ALMEIDA

**Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e
Leishmania em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do
Estado do Espírito Santo**

São Paulo

2011

ALINY PONTES ALMEIDA

Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo

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 a 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

2011

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
20/11/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2416
FMVZ

Almeida, Aliny Pontes

Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cercopithecus thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo / Aliny Pontes Almeida. -- 2011.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Cercopithecus thous*. 2. Canídeos silvestres. 3. Doenças infecciosas.
I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo", protocolado sob o nº1753/2009, utilizando amostras de órgãos e carrapatos de 60 (sessenta) cachorros-do-mato, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* and *Leishmania* in free-living crab-eating-fox (*Cerdocyon thous*) in the State of Espírito Santo", protocol number 1753/2009, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 03 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

Nome: ALMEIDA, Aliny Pontes

Título: Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo.

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família que tanto me auxiliou na longa caminhada até aqui.

Aos amigos que me apoiaram e me fortaleceram nos momentos de desesperos.

Ao meu orientador Marcelo Bahia Labruna pela paciência e compreensão e principalmente por confiar em minha capacidade!

À querida amiga e professora Tayse Domingues de Oliveira, por ter cedido com tanto carinho e confiança o material da pesquisa

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram na caminhada até aqui.

Ao Prof. Marcelo Labruna por tanto ter me ensinado e me orientado nos momentos de desorientação total. Pelo carinho e paciência e por ter sido o melhor e mais apaixonado profissional que eu já conheci até hoje. Você sempre será um grande exemplo.

Ao Prof. Paulo pela ajuda, paciência e preciosos ensinamentos pelos corredores do VPS.

A todos os professores do setor que muito me ensinaram. Em especial à profa. Solange, Profa. Sônia, Prof. Silvio, Prof. Leonardo, Prof. Jerez e Prof. Rodrigo.

Agradeço carinhosamente a Lili por ter-me encorajado a procurar o prof. Labruna e que tanto me auxiliou até minha entrada no mestrado, assim como minha grande amiga Jam, muito obrigada por tudo.

Agradeço a colega Iara por ter me iniciado na vida do PCR, a Fer e a Mariana por me ensinar os detalhes e segredos da técnica. Por ter tido paciência quando eu lhes pedia todos os protocolos e pra me tirarem longas e idiotas dúvidas.

Agradeço calorosamente ao Jonas, Gaúcho e ao Pedrinho pelos momentos de piadas e gargalhadas.

Ao amigo Thiago, por arrumar minhas bagunças e ter sido um ótimo companheiro de Natiruts, sem falar na identificação de minhas ninfas. E ao Flavinho, parceiro de Rondônia, pelos momentos de raiva e risadas.

Agradeço também a amiga Amália pelas longas conversas na copa e momentos de risadas na microscopia eletrônica depois de tanto éter. Só deixo aqui minha revolta em ter que ficar escutando música Italiana o dia todo no lab, mama mia.

A querida amiga Aline, por ter sido um ótimo ombro amigo e companheira de pizza nesse período.

Agradeço a grande amiga Bruna, pela companhia nas baladas, nas noites de filmes, nos finais de semana, feriados... enfim, por ter feito meus últimos meses em São Paulo mais alegres e agitados!

Agradeço ao amigo Renatinho por também ter me ensinado muito sobre o funcionamento do Lab e mostrar onde cada coisa é escondida. E também a Hilda por manter no Lab um exemplo em organização.

À Sheila por ter feito todo o seqüenciamento dos meus materiais e ter tido extrema paciência comigo quando cobrava os resultados.

Agradeço as amigas do LAB, Carol, Gisele (Lolo), Haila, Sueli, Camila, Karen, Jamila, Iracema e ao Malheiros, pelos momentos descontraídos na sala da pós.

Agradeço verdadeiramente aos sites de jogos on-line que me ajudaram a distrair a cabeça e não me deixaram pirar quando nada dava certo. Poderiam parecer momentos de vagabundagem, mas eram sim momentos de desanuviar a mente.

RESUMO

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo.** [Survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* and *Leishmania* in free-living crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in the State of Espírito Santo]. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Foram coletados cinquenta e oito (58) amostras de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre, provenientes do Estado do Espírito Santo, Brasil. Os animais eram mortos por atropelamento ao longo da rodovia estadual ES-060 que liga os municípios de Vila Velha à Guarapari, passando por duas reservas florestais de Mata Atlântica. Todos os animais eram encaminhados para a Universidade de Vila Velha – UVV pela concessionária RodoSol, onde passavam por detalhado exame necroscópico com coleta de tecidos e ectoparasitas para pesquisa de patógenos pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Todas as amostras obtidas foram testadas quanto à presença de agentes pertencentes à família Anaplasmataceae e membros dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Coxiella*, *Leishmania*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia*. No total foram colhidos 25 espécimes de carrapatos, todos em estágio ninfal e pertencentes à espécie *Amblyomma cajennense*. Na pesquisa de patógenos pela PCR, não foi encontrada nenhuma amostra de animal ou carrapato positiva para *Leishmania* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp, *Babesia* spp e *Coxiella* spp. Das 58 amostras de tecidos, 29 (50%) foram positivas para *Hepatozoon* spp no gene 18S rRNA, tendo sido identificado dois genótipos, um denominado *Hepatozoon* sp. ex *Cerdocyon thous*, presente em 96,55% dos animais testados, com máxima similaridade de 98,67% com a espécie *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377). O outro genótipo foi encontrado em somente um animal (3,44%), denominado *Hepatozoon* sp. P20 *Cerdocyon thous*, que apresentou máxima similaridade de 97,5% com *Hepatozoon* sp. 744C (EU430234). Na pesquisa para *Ehrlichia* spp, seis amostras foram positivas (10,34%). As seis amostras foram caracterizadas como uma possível nova espécie de *Ehrlichia*, denominada *Ehrlichia* sp. ex *Cerdocyon thous*, com máxima similaridade de 97,57%

com a espécie *Ehrlichia ruminantium* (DQ482915) para o gene 16S e 82,51% similar com *E. ruminantium* str. Gardel (CR925677) para o gene *dsb*. Todas as espécies de carrapatos foram negativas. *Hepatozoon* spp e *Ehrlichia* spp são agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, com potencial zoonótico, de potencial impacto para saúde animal e humana.

Palavras-chave: *Cerdocyon thous*. Canídeos silvestres. Doenças infecciosas.

ABSTRACT

ALMEIDA, A. P. **Survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* and *Leishmania* in free-living crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in the State of Espírito Santo**. [Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo]. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

We collected samples from fifty-eight (58) free-living crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from the State of Espírito Santo, Brazil. All animals were hit by vehicles passing through the highway ES-060, which crosses an Atlantic rainforest reserve, located between the cities of Guarapari and Vila Velha. The animals were collected by the Rodosol Company, and taken to the University of Vila Velha - UVV, where they underwent post-mortem examination, and collection of tissue samples and ectoparasites for research through the polymerase chain reaction (PCR) technique. All samples were tested for the presence of agents belonging to the family Anaplasmataceae and members of the genera *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Coxiella*, *Leishmania*, *Hepatozoon*, and *Ehrlichia*. We collected 25 specimens of nymphal ticks, which were all identified as *Amblyomma cajennense*. Search of pathogens by PCR did not find any positive animal or tick sample for *Leishmania* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp, *Babesia* spp and *Coxiella* spp. From the 58 tissue samples, 29 (50%) were positive for *Hepatozoon* sp by the PCR targeting the 18S rRNA gene. Amplicons generated two different genotypes, one named *Hepatozoon* sp. ex *Cerdocyon thous*, present in 96.55% of the animals, with a maximum of 98.67% similarity with the sequence of *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377); the second genotype was found in only one animal (3.44%), named *Hepatozoon* sp. P20 *Cerdocyon thous*, which showed maximum similarity (97.5%) with *Hepatozoon* sp. 744C (EU430234). The survey for *Ehrlichia* spp resulted in six positive samples (10.34%). The six samples were characterized as a possible new species of *Ehrlichia*, named *Ehrlichia* sp. ex *Cerdocyon thous*, with maximum similarity (97.57%) with the species *Ehrlichia ruminantium* (DQ482915) for the 16S and 82.51% similar to *E. ruminantium* str. Gardel (CR925677) for the *dsb* gene. All species of ticks were negative for all pathogens searched. *Hepatozoon* spp and *Ehrlichia* spp are tick-

borne infectious agents with zoonotic potential; the present findings are of potential impact for both animal and human health.

Keywords: *Cerdocyon thous*. Wild carnivores. Infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Foto satélite da rodovia estadual (Rodovia do Sol) ES-060, localizada entre os municípios de Vitória e Guarapari (menor aumento à direita da foto), cortando uma área de reserva ambiental, que inclui o Parque Estadual Paulo César Vinha e o Parque Municipal de Jacarenema.----- 41
- Figura 2 - Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) morto por atropelamento ao longo da rodovia do Sol ES-060, coletado para exame necroscópico e coleta de material biológico para análise molecular.----- 41
- Figura 3 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta. PCR para *Babesia* spp. Amostras de baço de cachorro-do-mato onde as amostras 11, 14, 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 28 e 29 são positivas. C+: controle positivo; C-: controle negativo; CM: controle do mix; **: livre de amostras.----- 50
- Figura 4 - Gráfico com distribuição anual relacionadas ao sexo e resultados pela técnica da PCR nas amostras de *Cerdocyon thous* avaliadas, positivos para *Hepatozoon* spp (■/ □). e *Ehrlichia* spp (▨).----- 56
- Figura 5 - Árvore filogenética de *Ehrlichia* sp. de *Cerdocyon thous* (vermelha) mostrando a relação entre outras espécies de *Ehrlichia*, baseada na seqüências do fragmentos do gene 16S. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio.----- 58
- Figura 6 - Árvore filogenética de *Ehrlichia* sp. de *Cerdocyon thous* (vermelha) mostrando a relação entre outras espécies de *Ehrlichia*, baseada na seqüências do fragmentos do gene *dsb*. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio.----- 59
- Figura 7 - Árvore filogenética de *Hepatozoon* sp. P20 (vermelha) e *Hepatozoon* sp. *Cerdocyon thous* (negrito) demonstrando a relação entre outras espécies de *Hepatozoon*, baseada nas seqüências do fragmento do gene 18S. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio.----- 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista de todos os <i>primers</i> utilizados na elaboração do projeto.-----	45
Tabela 2 -	Listas de <i>primers</i> utilizados na detecção de outros agentes pesquisados.-----	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SM	Mamífero silvestre
STAR	<i>Southern Tick Associated Rash Illness</i>
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unidade
UV	Ultravioleta
UVV	Universidade de Vila Velha

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
X	Vezez

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	Rickettsiose, Ehrlichiose E Anaplasmosse	27
2.1.1	Rickettsiose	27
2.1.2	Ehrlichiose	29
2.1.3	Anaplasmosse	31
2.2	Babesiose	32
2.3	Hepatozoonose	33
2.4	Leishmaniose	35
2.5	Borreliose	37
2.6	Febre Q	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Coleta do Material	40
3.2	Identificação dos carrapatos	42
3.3	Extração de DNA	42
3.3.1	Carrapatos	43
3.3.2	Tecido e Sangue	43
3.4	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	44
3.4.1	<i>Rickettsia</i> spp	44
3.4.2	Família Anaplasmataceae	46
3.4.3	<i>Ehrlichia</i> spp	46
3.4.4	<i>Babesia</i> spp	48
3.4.5	<i>Hepatozoon</i> spp	48
3.4.6	<i>Leishmania</i> spp	49
3.5	Leitura e Análises dos produtos de PCR	50
3.5.1	Sequenciamento	51
3.5.2	Análises Filogenéticas	52
3.6	Outras análises	52
3.6.1	<i>Borrelia</i> sp.	52
3.6.2	<i>Coxiella</i> sp.	54
4	RESULTADOS	55

4.1	Identificação dos carrapatos-----	55
4.2	Coleta de material e extração de DNA-----	55
4.3	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)-----	56
4.3.1	Família Anaplasmataceae e <i>Ehrlichia</i> spp-----	56
4.3.2	<i>Hepatozoon</i> spp e <i>Babesia</i> spp-----	60
4.3.3	<i>Leishmania</i> spp e <i>Rickettsia</i> spp-----	63
4.3.4	<i>Coxiella</i> spp e <i>Borrelia</i> spp-----	63
5	DISCUSSÃO-----	64
6	CONCLUSÕES-----	70
	REFERÊNCIAS-----	71
	ANEXOS-----	86

1 INTRODUÇÃO

Os animais silvestres de vida livre representam uma valiosa fonte de informações regionalmente desconhecidas. Podem ser considerados indicadores de qualidade ambiental, por demonstrarem, através de suas doenças, os desequilíbrios do ambiente a que estão expostos. A saúde e o bom estado nutricional dos mesmos sugerem boa capacidade de suporte e qualidade ambiental para a sobrevivência da espécie.

As doenças re-emergentes são de grande importância para a saúde pública, representando um grande risco para a vida humana. Algumas ressurgem de forma epidêmica, levando à altas morbidade e mortalidade, e outras de forma endêmica, restritas a algumas localidades, mas nada as impedem de se disseminarem e causar um grande impacto na população humana e até mesmo animal. Essas doenças representam um grande risco para os seres humanos susceptíveis às “novas doenças”, e um desafio para os médicos e, quando envolvidos os animais, os médicos veterinários, que visam buscar formas de controlar e eliminá-las.

Os animais a serem estudados podem ser portadores de doenças de importância zoonótica e re-emergentes, sendo de grande relevância para a saúde pública a existência destas doenças nestas áreas, especialmente quando a região de procedência dos animais abrange uma área adjacente a zonas urbanas e de importância turística. Assim, estratégias racionais e estratégicas de prevenção devem ser buscadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A família Canidae é pertencente à ordem Carnívora, representada por 34 espécies, dentro de 14 gêneros. A classificação taxonômica dos canídeos é baseada na morfologia, cariótipo e biologia molecular (FOWLER; MILLER, 2003). O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 [= *Dusicyon thous*]) está classificado no Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Carnivora, Família Canidae, Gênero *Cerdocyon* e Espécie *thous*. São reconhecidas cinco subespécies: *C. t. thous*, *C. t. aquilus*, *C. t. azarae*, *C. t. entrerianus*, e *C. t. germanus* (ZUBIRI; HOLFMANN; MACDONALD, 1990; MARQUES et al., 2002).

O cachorro-do-mato não é considerado uma espécie em extinção (MARQUES et al., 2002). Essa espécie é relatada habitando diferentes regiões, como baixadas, savanas, cerrado, caatinga, bosques, florestas semi-decíduas, floresta Atlântica, floresta de Araucária, savana isolada dentro de planície de floresta Amazônica, e floresta de montanha (ZUBIRI; HOLFMANN; MACDONALD, 1990). A distribuição geográfica do *Cerdocyon thous* limita-se ao nordeste e sudeste da América, incluindo o litoral e regiões de montanha do norte da Colômbia e da Venezuela e Florestas Atlânticas do leste do Brasil até costa ocidental da Colômbia (ZUBIRI; HOLFMANN; MACDONALD, 1990; FOWLER; MILLER 2003). Sua distribuição central é conhecida em planície de floresta Amazônica, limitada a áreas do nordeste do Rio Amazonas e Rio Negro, sudeste do Rio Amazonas e Rio Araguaia, e sul de Rio Beni, Bolívia (ZUBIRI; HOLFMANN; MACDONALD, 1990).

Algumas doenças infecciosas acometem canídeos silvestres tais como erliquiose, causada por *Ehrlichia canis*, enfermidade transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* dos canídeos domésticos. Estes animais também são susceptíveis a algumas bactérias, vírus e dermatites infecciosas, tais como *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* sp, *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatidis* (FOWLER; MILLER, 2003).

Casos de parasitoses por ectoparasitas, Ixodídeos e Sifonápteros, acometendo cachorro-do-mato de vida livre, foram relatados em alguns trabalhos no Brasil, tais como: Rodrigues e Daemon (2004), na Zona da Mata Mineira; Cerqueira et al.

(2000) na região de Jacobina, Bahia; Labruna et al. (2002) na região da hidrelétrica de Porto-Primavera, entre São Paulo e Mato Grosso do Sul e; Labruna et al. (2005) em diferentes regiões brasileiras. As espécies de carrapatos relatadas parasitando cachorro-do-mato no Brasil são: *Amblyomma aureolatum*; *A. cajennense*; *A. dubitatum*; *A. fuscum*; *A. ovale*; *A. parvum*; *A. tigrinum*; *Dermacentor nitens*; *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*; e *Rhipicephalus sanguineus* (LABRUNA et al., 2005).

2.1 Rickettsiose, Ehrliquiose e Anaplasmosse

As bactérias pertencentes às famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae da ordem Rickettsiales foram recentemente reclassificadas por análises genéticas e reagrupadas, sendo o gênero *Ehrlichia* incluído na família Anaplasmataceae. Os gêneros *Rickettsia* e *Orientia* permaneceram na família Rickettsiaceae. O gênero *Ehrlichia* também sofreu modificações sendo as espécies *Ehrlichia phagocytophila* (= *Ehrlichia equi*) e *Ehrlichia platys* incluídas no gênero *Anaplasma* e, *Ehrlichia risticii* e *Ehrlichia sennetsu* no gênero *Neorickettsia* (DUMLER et al., 2001).

2.1.1 Rickettsiose

A família Rickettsiaceae congrega bactérias Gram-negativas α -proteobacteria, aeróbicas intracelulares obrigatórias (OLANO, 2005; SAHNI; RYDKINA, 2009), que se multiplica por fissão binária e estão associadas a vetores invertebrados (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; RAOULT et al., 2005). Em seres humanos, causam as doenças conhecidas como Tifo endêmico, Tifo epidêmico e Febre maculosa, sendo somente a Febre maculosa considerada importante para carnívoros (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

A *R. rickettsii* é o agente da “*Rocky Mountain Spotted Fever*” (RMSF) ou Febre Maculosa Brasileira (SAHNI; RYDKINA, 2009). Esta espécie é a mais patogênica do gênero e infecta cães e seres humanos em áreas endêmicas em todo o mundo. É transmitida por mais de 20 espécies de carrapatos ixodídeos (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; LABRUNA, 2009). No Brasil, os carrapatos relatados como transmissores dessa bactéria são *Amblyomma aureolatum* (PINTER; LABRUNA, 2006) e *Amblyomma cajennense* (GUEDES et al., 2005). Moraes-Filho et al. (2009) relatou a primeira detecção molecular de *R. rickettsii* em *Rhipicephalus sanguineus* em São Paulo, Brasil, sugerindo que essa espécie de carrapato possa estar associada à transmissão deste agente na região.

R. rickettsii chega a corrente sanguínea através da secreção salivar de um carrapato em parasitismo e infecta as células endoteliais do hospedeiro vertebrado, levando à vasculite, necrose vascular e hemorragias com conseqüente 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 púrpuras e alterações neurológicas, sensibilidade dos linfonodos, articulações e músculos (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

Febre Maculosa Brasileira (FMB) foi primeiramente reportada em 1920, e com o aumento contínuo de casos ao longo dos anos, atualmente é considerada uma importante doença re-emergente no Brasil (LABRUNA, 2009). Casos desta doença em seres humanos já foram notificados nos estados do Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2010), com casos confirmados e publicados 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).

Semelhante aos 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, trabalhos 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 é 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 *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). Em canídeos silvestres há relatos sorológicos de infecção por *Rickettsia* em coiotes (*Canis latrans*) na Coreia (CAMER; LIM, 2008) e no cachorro silvestre raccoon (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) em Nebraska (BISCHOF; ROGERS, 2005). O Diagnóstico de Febre Maculosa pode ser feito por métodos sorológicos (HORTA et al., 2007), detecção molecular (PCR) (KIDD et al., 2008) e isolamento do agente (LABRUNA et al., 2007a).

2.1.2 Ehrliquiose

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

Essas bactérias podem causar duas doenças distintas, a Ehrliquiose 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*; vide abaixo).

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 (DANTAS-TORRES, 2008a). Em cães no Brasil é considerada uma doença amplamente distribuída (DANTAS-TORRES, 2008a), com alta casuística (41,3%) no estado de Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010).

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

De acordo com pesquisas sorológicas, *E. canis* pode infectar canídeos silvestres, tais como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (FISHMAN et al., 2004), sendo que nos Estados Unidos, estes animais são considerados possíveis reservatório dessas bactérias (GREENE, 2006). Em infecção experimental de *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 sequência 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 Ehrliquiose (LOUW; ALLSOPP; MEYER, 2005). É transmitida por aproximadamente 20 espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente por *A. variegatum* e *A. haebreum* na África

(BARRÉ; UILENBERG, 2010). As espécies de *A. maculatum* e *A. cajennense* demonstraram capacidade de transmissão em condições laboratoriais, mas até hoje não foram implicados como vetores (WALKER; OLWAGE, 1987).

O diagnóstico de Ehrliquiose é baseado em esfregaço sanguíneo, citologia corada pelo corante Giemsa, sorologia, cultura de organismos, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008a).

2.1.3 Anaplasmoses

Anaplasmoses 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; BARRÉ; 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 tida como reservatório por apresentar uma 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, casos de *A. phagocytophilum* em cães têm sido demonstrados pela técnica de PCR na Venezuela (SUKSAWAT et al., 2001). No Brasil, a Anaplasmoses de maior importância para cães é a causada pela *A. platys*, amplamente distribuída e geralmente associada à infecções concomitantes com outros patógenos, tais como *E.*

canis e *Babesia canis vogeli*. O vetor do *A. platys* ainda não está bem elucidado, mas a possibilidade do *Rhipicephalus sanguineus* estar envolvido na transmissão vem sendo estudada (DANTAS-TORRES, 2008a).

O Diagnóstico dessa doença tem sido realizado por teste de sorologia, cultivo do organismo, PCR ou mesmo pela visualização do agente parasitando plaquetas em esfregaço de sangue periférico (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008a).

2.2 Babesiose

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). Recentemente, por bases em análises moleculares, a espécie *B. canis* foi subdividida em três subespécies geneticamente distintas: *B. canis canis*; *B. canis rossi*; e *B. canis vogeli* (ALMOSNY, 2002; IRWIN, 2009). No Brasil, a espécie prevalente em cães é a *B. vogeli* (PASSOS et al., 2005; TRAPP et al., 2006; COSTA-JÚNIOR et al., 2009), com sorotividade (33,7%) em cães domésticos no Estado do Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010).

A babesiose é transmitida pelos 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). Em felinos as espécies relatadas são *B. felis*, *B. cati*, *B. canis* ssp. *presentii* e *B. herpailuri* (ALMOSNY, 2002; TABOADA; LOBETTI, 2006). Em humanos é uma doença febril aguda que pode ser confundida com malária, e por vezes fatal (ALMOSNY, 2002), podendo ser causada por diversas espécies como *Babesia microti*, *Babesia divergens*, “*Babesia divergens-like*”, entre outras (TABOADA; LOBETTI, 2006). No Brasil há somente um relato com

diagnóstico direto de babesiose humana, porém sem confirmação molecular (ALECRIM et al., 1983).

Em canídeos silvestres há uma alta ocorrência (de 31% a 39%) de *B. microti*-like em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) na América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2010). Alta prevalência também foi observada na África do Sul por diagnóstico molecular em cães silvestres (*Lycaon pictus*) pela subespécie *B. canis rossi*, (MATJILA et al., 2008). No Brasil há relatos em uma raposinha do mato (*Pseudalopex vetulus*), espécie geneticamente similar ao cachorro-do-mato (MARTINS et al., 2006), graxaim do mato (*Lycalopex gymnocercus*) (RUAS et al., 2003), e, em um lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (SERRA-FREIRE et al., 1993). No Brasil existe um relato de *Babesia* sp. diagnosticado por histologia através da visualização do protozoário em sangue de órgãos internos de um cachorro-do-mato (PARAENSE; VIANNA, 1948). Em *Cerdocyon thous* até hoje não há diagnóstico molecular de Babesiose.

Usualmente o diagnóstico é feito por visualização microscópica do agente parasitando eritrócitos, em esfregaço de sangue periférico (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Outras técnicas também empregadas são sorologia, Imunofluorescência e PCR (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; TABOADA; LOBETTI, 2006).

2.3 Hepatozoonose

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

ocorre pela ingestão do carrapato contendo oocistos maduros em sua hemocèle (ALMOSNY, 2002; DANTAS-TORRES, 2008a). Outras espécies de carrapatos associados à provável transmissão de *Hepatozoon* no Brasil são: *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*, geneticamente distinta da *Hepatozoon canis*, 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, já a fase de merogonia e gamogonia ocorre em monócitos nas infecções por *H. americanum*, e em neutrófilo por *H. canis*. Outra diferença está nas formas de merontis, que apresentam morfologia e localização distintas entre essas espécies (EWING; PANCIERA, 2003).

No Brasil esta doença 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 (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), coiote (*Canis latrans*) (DAVIS; ROBINSON; CRAIG, 1978; KOCAN et al., 1999), chacal de dorso-

negro (*Canis mesomelas*) (McCULLY et al., 1975). No Brasil já foi diagnosticada em lobo-guará (*Cerdocyon brachyurus*), Raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (ANDRÉ et al., 2010), e no cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) nos estados de São Paulo (ALENCAR; KOHAYGAWA; SANTARÉM, 1997; ANDRÉ et al., 2010) e Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

Diferentes genótipos de *Hepatozoon* têm sido descritos em cães (PALUDO et al., 2005), felinos (METZGER et al., 2008) e canídeos silvestres (ANDRÉ et al., 2010) do Brasil. 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, imunoistoquímica, sorologia e PCR (EWING; PANCIERA, 2003; KARAGENC et al., 2006; LI et al., 2008).

2.4 Leishmaniose

A Leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* que infectam animais e o homem nas regiões quentes dos Velho e Novo Mundo, que determinam doenças do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (REY, 1991; DAVID; CRAFT, 2009). Diversas espécies deste protozoário (*Leishmania*, família *Trypanosomatidae*), podem causar a leishmaniose (CARLTON; MCGAVIN 1998).

Segundo Rey (1991), pode-se separar as leishmanioses de acordo com suas características clínicas em quatro grupos: leishmaniose cutânea; leishmaniose mucocutânea; leishmaniose visceral ou calazar e; leishmaniose cutânea difusa. A Leishmaniose tegumentar americana é causada pela infecção de *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* ou *Leishmania panamensis* (DAVID; CRAFT, 2009). A leishmaniose visceral ou calazar é causada pelo parasitismo das leishmanias do complexo "*Leishmania donovani*" (*Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*), a única importante para canídeos (QUINNELL;

COURTENAY, 2009). A leishmaniose visceral ocorre nas Américas, na Ásia, na África e na Europa. Nas Américas, a leishmaniose visceral incide, sobretudo, no Brasil, na Venezuela e na Argentina, sendo que as principais áreas endêmicas do Brasil encontram-se no Nordeste do Maranhão até a Bahia (REY, 1991).

Apenas dois gêneros de mosquitos são realmente importantes para a transmissão da leishmaniose: *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (REY, 1991). Recentes pesquisas no Brasil vêm sugerindo um possível papel de carrapatos (*R. sanguineus*) na transmissão da leishmaniose visceral para cães domésticos (COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2008b).

O *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral do Novo Mundo (COURTENAY et al., 2002), está presente em todos os países da América do Sul, exceto no Chile, onde o vetor é desconhecido. *Lutzomyia longipalpis* também tem sido a mais encontrada nas áreas do Estado do Maranhão onde o calazar aparece de forma endêmica (REBÊLO et al., 1999).

Segundo Courtenay, Quinnell e Chalmers (2001), raposas apresentam altas taxas de contato com cachorros domésticos infectados e com *L. longipalpis*. O *Cerdocyon thous* é a única espécie de raposa encontrada naturalmente infectada pela *Leishmania chagasi* na região neotropical (COURTENAY et al., 1996), sendo este o único canídeo silvestre, que age como reservatório da *Leishmania* no Brasil e na Venezuela. O gambá (*Didelphis marsupialis*) também é considerado um reservatório no Brasil, Colômbia e Venezuela (FARRELL, 2002).

Em seu experimento, Courtenay et al. (2002) capturou 37 raposas (*Cerdocyon thous*) de vida livre em um estudo de campo realizado em duas localidades do município de Salvaterra, Marajó, Pará, Brasil. Dos animais avaliados, as prevalências de infecção para Leishmaniose visceral zoonótica, em todas as amostras foram: 74,0% em sorologia, 15,2% em PCR e 25,8% em cultura de parasita *in vivo* e *in vitro*. Lainson et al. (1990) em seu trabalho, relata a ocorrência de infecção oculta por *Leishmania chagasi*, causadora da leishmaniose visceral, em 12 de 22 *Cerdocyon thous* de vida livre, na mesma localidade. Este mesmo autor também relata a transmissão experimental do parasito *Leishmania* para uma raposa pela picada de somente dois exemplares de *Lutzomyia longipalpis* infectados,

sugerindo que o vetor *L. longipalpis* possa manter a *L. chagasi* enzoótica em raposas.

No Brasil, há relatos de infecção natural em *Cerdocyon thous* nos Estados do Pará (COURTENAY et al., 2002), Minas Gerais (SILVA et al., 2000), Mato Grosso (SOUZA et al., 2010b) e São Paulo (CATENACCI et al., 2010).

2.5 Borreliose

No gênero *Borrelia* englobam-se as bactérias espiroquetas que infectam o homem e são transmitidas pela picada do carrapato (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Parte dessas bactérias, classificada dentro do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato e transmitida por espécies de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, inclui as espécies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (encontrada nos Estados Unidos e Euroásia), *B. garinii* e *B. afzelli* (observadas na Eurásia), que causam a doença conhecida como Lyme borreliose ou Doença de Lyme. Um outro grupo é constituído pela espécie de *B. lonestari*, transmitida pelo carrapato *Amblyomma americanum*, causando a doença conhecida como STARI (*Southern Tick Associated Rash Illness*) (YOSHINARI et al., 2010).

No Brasil o primeiro caso de doença de Lyme, supostamente causada por *B. burgdorferi*, foi relatado em 1992 e atualmente encontra-se em ampla distribuição. As manifestações clínicas desta doença são amplamente diferentes e por isso, no Brasil, essa doença foi nomeada como Doença de Lyme-Símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari, proposto por Yoshinari et al. (2010). Causada por uma espiroqueta do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato de morfologia incompleta e latente, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* e/ou *Rhipicephalus*, que levam ao desenvolvimento de eritema migratório, alterações neurológicas e cardíacas, distintas da forma clássica da Doença de Lyme observada na América do Norte e Euroásia (YOSHINARI et al., 2010), porém, o agente etiológico da doença, a

Borrelia burgdorferi, nunca foi isolado no país, seja de casos humanos, seja de carrapatos ou de possíveis mamíferos reservatórios (MANTOVANI et al., 2007).

Essa doença apresenta um ciclo silvestre que envolve aves, lagartos e pequenos mamíferos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005), como o esquilo cinzento na América do Norte (NIETO et al., 2010). Em canídeos, há um relato de infecção natural por *Borrelia* em uma raposa (*Vulpes vulpes schrencki*) no Japão (ISOGAL et al., 1994). O diagnóstico pode ser realizado através do isolamento do agente, PCR e sorologia (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). No Brasil, por se tratar de uma bactéria com diferenças biológicas e morfológicas das demais do gênero *Borrelia*, as técnicas padrões utilizadas podem não ser eficientes e gerar resultados falso-negativos, tornando assim essa doença subdiagnosticada no país (YOSHINARI et al., 2010).

2.6 Febre Q

O gênero *Coxiella* é constituído por pequenas bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias (MARRIE, 1990; SCOLA, 2002), pertencentes à ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae* (HEINZEN; HACKSTADT; SAMUEL, 1999; MAURIN; RAOULT, 1999), agente causador da doença zoonótica conhecida como Febre Q (PAROLA; RAOULT, 2001; KAZAR, 2005), que acometem humanos e animais domésticos e silvestres (MARRIE, 1990; MAURIN; RAOULT, 1999).

A única espécie descrita é a *Coxiella burnetii*, amplamente distribuída, com exceção das regiões da Antártica (MAURIN; RAOULT, 1999; WOLDEHIWET, 2004). Casos de Febre Q por sorodiagnóstico no Brasil já foram diagnosticados nos estados de Minas Gerais (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2005) e Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2009), e pela técnica de Imunoistoquímica em São Paulo (SICILIANO et al., 2008). Apesar de existirem dados soro epidemiológicos sobre a ocorrência da *Coxiella*, os relatos são raros e os casos subdiagnosticados (SICILIANO et al., 2008). O diagnóstico no Brasil é baseado em achados clínicos, sorológicos e achados de

necropsias (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2006). Recente publicação relata a primeira detecção molecular de *Coxiella burnetii* em seres humanos no país (LEMOS et al., 2010).

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

Variações genéticas de *Coxiella* têm sido descritas em amostras de cabritos, ovelhas, humanos (MAURIN; RAOULT, 1999) e carrapatos (REEVES et al., 2006). Em canídeos silvestres, o único trabalho encontrado refere-se à infecção experimental de *Coxiella* em raposa (*Vulpes vulpes*) (REHN, 1958).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A cronologia e técnicas utilizadas para a elaboração do trabalho encontram-se nos tópicos seguintes.

3.1 Coleta de Materiais

Os sessenta (60) exemplares de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre mortos por atropelamento na Rodovia do Sol ES-060 foram coletados pela concessionária Rodosol, no período de 2004 a 2009, como parte do Programa de Monitoramento de Fauna Atropelada, e foram encaminhados ao Laboratório de Fauna da Conserv-Rodosol. O repasse dos cadáveres foi realizado mediante assinatura de termo de repasse de animal silvestre ao Laboratório de Patologia Veterinária do Centro Universitário de Vila Velha – UVV, vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Necropsia de Animais Silvestres Mortos por Atropelamento na Rodovia do Sol (ES-060)”, sob coordenação da Professora Tayse Domingues de Souza. A rodovia do Sol ES-060 liga os municípios de Vila Velha e Guarapari, passando por duas reservas florestais, o Parque Estadual Paulo César Vinha e o Parque Municipal de Jacarenema (**Figura 1**).

Figura 1 – Foto satélite da rodovia estadual (Rodovia do Sol) ES-060, localizada entre os municípios de Vitória e Guarapari (menor aumento à direita da foto), cortando uma área de reserva ambiental, que inclui o Parque Estadual Paulo César Vinha e o Parque Municipal de Jacarenema.

Figura 2 – Cachorro-do-mato (*Cerdouon thous*) morto por atropelamento ao longo da rodovia do Sol ES-060, coletado para exame necroscópico e coleta de material biológico para análise molecular. Ficha de identificação na pata posterior direita

Os animais eram identificados e recebiam uma numeração corrida de acordo com a chegada (**Figura 2**). Para a identificação era utilizada a sigla SM (mamífero silvestre) acompanhado do número arábico crescente (de 1 a 120). Todas as informações quanto à localização geográfica do animal coletado, sexo, peso, tamanho e descrição macroscópica do mesmo eram anotadas. Os animais passaram por exame físico, coleta de ectoparasitas e de amostras sanguíneas. Os ectoparasitas foram coletados em frascos sem solventes e armazenados sob congelamento (-20 °C). As amostras sanguíneas foram coletadas através de agulha e seringa estéreis e transferidas para microtubos de 1,5 ml e congelados à -20 °C.

A técnica de necropsia realizada foi conforme a descrita por Silva e Vilorio (2000). Foram coletados pequenos fragmentos de pelo menos um órgão - fígado, baço, linfonodo ou rim – de cada animal, que foram armazenados em microtubos de 1,5 ml, congelados em freezer (-20°C) e testados conforme descrito a seguir, através de técnicas de diagnóstico pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

3.2 Identificação dos Carrapatos

Todos os carrapatos encontravam-se em estágio ninfal e a identificação taxonômica das espécies foram realizadas segundo Martins et al. (2010).

3.3 Extração de DNA

As técnicas utilizadas para cada tipo de amostra estão detalhadas a seguir.

3.3.1 Carrapatos

Os carrapatos foram separados individualmente para a extração em microtubos de 1,5 ml, conforme previamente descrito por Sangioni et al. (2005), adaptado. Cada espécime foi triturada com auxílio de agulha romba estéril, acrescido de 150 µl de solução tampão TE pH 8,0 (10mM TRIS HCl; 1mM EDTA) e 450µl de Isotiocianato de guanidina, seguido de homogeneização e adição de 100µl de Clorofórmio. Após centrifugação (12.000 *g* por 5 minutos), foram recuperados aproximadamente 300µl do sobrenadante e transferidos para um novo microtubo de 1,5 ml estéril, sendo acrescidos 600µl de Isopropanol e armazenado em freezer (-20°C) por no mínimo duas horas. Posteriormente, as amostras eram novamente centrifugadas (12.000 *g* à 4°C por 15 minutos) e o sobrenadante descartado, o sedimento foi ressuspense em 800µl de Etanol 70% e novamente centrifugado (12.000 *g* à 4°C por 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento exposto à temperatura ambiente por uma hora e em seguida acrescido 60µl de TE e aquecido em termobloco (56°C por 5 minutos). Essa solução final (DNA diluído em TE) foi armazenada em freezer (-20°C) até sua utilização na PCR. Para cada 10 amostras extraídas foi utilizado um controle negativo (água destilada livre de DNA).

3.3.2 Tecido e Sangue

A extração de DNA, nas amostras de sangue e órgãos, foi realizada através do kit comercial da Qiagen (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram eluídas em 100 µl de tampão TE. Para cada 20 amostras extraídas, foi utilizado um controle negativo (água destilada livre de DNA).

3.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram testadas individualmente para pesquisa de DNA de *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Babesia* e *Leishmania*, conforme descrito abaixo. Para avaliação quanto à quantidade de DNA obtido na extração, foi realizada a quantificação de DNA nas amostras extraídas em Espectrofotômetro UV (BioPhotometer plus, Eppendorf®). Todas as amostras com quantidade abaixo de 20 ng/μl de DNA foram re-extraídas.

3.4.1 *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 de 401 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia* (**Tabela 1**) (LABRUNA et al., 2004). As amostras positivas na primeira reação foram submetidas a uma nova reação com um par de *primers* (*Rr190.70p* senso e *Rr190.602n* anti-senso) que amplificam um fragmento de 532-pb do gene da proteína externa de membrana 190-kDa (*OmpA*), restrito as *Rickettsias* do grupo da Febre Maculosa (REGNERY; SPRUIL; PLIKAYTIS, 1991). Para cada reação eram utilizados controles negativos (água de miliqui livre de DNA) e positivos (*Rickettsia parkeri* cepa NOD).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200μl adicionando 2,5μl de DNA extraído acrescido de 22,5μl de Mix (12,6μl de água de miliqui; 4μl de Buffer [200mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen®]; 2,5μl de dNTP [Invitrogen®]; 1,25μl de cada *primer*; 0,75μl de Cloreto de Magnésio [50 mM, Invitrogen®]; e 0,15μl de Taq polimerase [Invitrogen®]), para um volume total de 25μl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®), para o gene *gltA* eram conforme segue: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos

à 72°C, e 7 minutos à 72°C; Para o gene *OmpA* foram seguidos: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 45 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C.

Tabela 1 - Lista de todos os *primers* utilizados na elaboração do projeto

Continua

Pares de primers e gene alvo	Especificidade	Seqüência dos primers (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referencia
<i>gltA</i>	Para o gênero <i>Rickettsia</i>			
CS-78 CS-323		F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401-pb	Labruna et al., 2004
<i>OmpA</i>	Grupo da Febre Maculosa			Regnery; Spruil; Plikaytis, 1991
Rr190.70 Rr190.602		ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	532-pb	
16S	Família Anaplasmataceae			Breitschwerdt; Hegarty; Hancoc, 1998
GE2 HE3		F- GTTAGTGGCAGACGGGTGAGT R- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	360-pb	
18S	Para o gênero <i>Babesia</i>			
BAB 33-57 BAB 432-409		F- GCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAA R- TTCCTTAGATGTGGTAGCCGTTTC	370-pb	Spolidorio et al., 2009
BAB2 143-167 BAB2 694-667		F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	551-pb	Este Trabalho
18S	Para o gênero <i>Hepatozoon</i>			
HEP-1 HEP-4		F- CGCGAAATTACCCAATTCTA R- TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	670-pb	Spolidorio et al. 2009
HEP2 144-169 HEP2 743-718		F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC R- ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG	574-pb	Este Trabalho
<i>Dsb</i>	Para o gênero <i>Ehrlichia</i>			
DSB-330		F- GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401-pb	Doyle et al., 2005
DSB-720 DSB-380		R- CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC F- ATTTTITAGRGATTTTCCAATACTTGG	349-pb	Este trabalho
16S	Para o gênero <i>Ehrlichia</i>			
EHR16SD EHR16SR		F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC R- TAGCACTCATCGTTTACAG	345-bp	Inokuma; Raoult; Brouqui, 2000
<i>k-DNA</i>	<i>Leishmania donovani</i>			
RV1		F- CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	145-pb	Lachaud et al., 2002

RV2		R- CCACCTGGCCTATTTTACACCA		
rRNA	Para o gênero <i>Leishmania</i>			
S4		F- GATCCAGCTGCAGGTTTACC	520-bp	<i>Uliana et al., 1994</i>
S12		R – GGTTGATTCCGTCAACGGAC		
S17		F- CCAAGCTGCCCAGTAGAAT	490-bp	<i>Savani et al., 2009</i>
S18		R- TCGGGCGGATAAAACCC		

3.4.2 Família Anaplasmataceae

Na PCR para *Anaplasmataceae*, cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers* denominados GE2'F2' senso e HE3 anti-senso, que amplificam um fragmento de 360-pb do gene 16S rRNA de praticamente todos os membros da família Anaplasmataceae (ANDERSON et al., 1992; BREITSCHWERDT et al., 1988). O protocolo de PCR utilizado foi o mesmo feito por Spolidorio (2009), com modificações.

A PCR foi realizada em solução total de 50µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA) e 0,2 mM de cada *primer*. As condições dos ciclos da PCR, efetuados em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®), consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos à 95°C, e 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C, e 30 segundos a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C. Controle positivo (DNA previamente de cães positivos para *Ehrlichia canis*) e controle negativo (água) foram incluídos em cada reação.

3.4.3 *Ehrlichia* spp

Na PCR para *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) e EHR16SD senso e EHR16SR anti-senso para o gene 16S (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000).

A primeira reação para o gene *dsb*, que amplifica um fragmento de 401-pb, foi realizada conforme protocolo descrito por Aguiar et al. (2007), com modificações. Com o objetivo de se aumentar a sensibilidade diagnóstica do teste, um novo *primer* (DSB-380) foi desenhado para a elaboração da técnica de Nested-PCR, que amplifica um fragmento de 349-pb do gene *dsb* (**Tabela 1**). Este protocolo de PCR é eficaz para amplificação de DNA de todas as espécies conhecidas atualmente do gênero *Ehrlichia* (LABRUNA et al., 2007b).

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

A PCR para o gene 16S foi realizado em solução total de 25 contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. As condições térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.4.4 *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 de *Babesia* spp, que amplificaram um fragmento de aproximadamente 370-pb, conforme previamente estabelecido em nosso laboratório (SPOLIDORIO et al., 2009). Nas amostras positivas, para melhor caracterização genética do agente, foi realizada outra PCR (BAB2) com novos pares de *primers* denominados BAB-143-167 senso e BAB-694-667 anti-senso, desenvolvidos para amplificar um fragmento de aproximadamente 551-pb do gene 18S rRNA, desenhados para a realização deste trabalho (**Tabela 1**). Controle positivo (DNA de cão infectado com *B. canis*) e controle negativo (água livre de DNA) foram utilizados em cada reação.

A PCR foi realizada em solução total de 50µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. As condições dos ciclos da primeira PCR (BAB1) consistiram-se em uma desnaturação inicial por 3 minutos à 95°C, e 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C, e 30 segundos a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C. Na segunda PCR (BAB2) a desnaturação inicial utilizada foi por 5 minutos à 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 58°C, e 30 segundos à 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final à 72°C.

3.4.5 *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, que amplificam um fragmento de aproximadamente 574-pb do gene 18S rRNA, que foram desenhados para a realização deste trabalho (**Tabela 1**). Para todas as reações da PCR foram utilizados controle positivo (DNA de *H. canis* obtido de cães domésticos do Estado do Espírito Santo) e controle negativo (água).

Todas as reações de PCR foram realizadas em solução total de 50µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. Os ciclos de temperaturas da primeira PCR (HEP1) constituíram de uma desnaturação inicial por 3 minutos à 95°C e 40 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos à 53°C, e 40 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final à 72°C. Na segunda PCR (HEP2) utilizou-se uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C.

3.4.6 *Leishmania* spp

Para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp as amostras foram testadas primeiramente com os *primers* RV1 senso e RV2 anti-senso (gene com 10.000 cópias), que amplificam um fragmento de 145-pb do gene mitocondrial *kinetoplast* (kDNA) (LACHAUD et al., 2002). As reações foram realizadas conforme protocolo previamente estabelecido (LACHAUD et al., 2002; SILVA et al., 2008), mostrando-se o mais sensível entre seis diferentes pares de *primers* para detecção de DNA de *Leishmania* em sangue de cães naturalmente infectados.

As reações de PCR foram realizadas em solução total de 50µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. As condições térmicas constituíram-se em uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C e 40 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 59°C, 30

segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72°C. O produto amplificado era analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

A primeira reação da PCR (para o gene kDNA) foi utilizada como triagem para detecção de possíveis animais positivos, por ampliar um fragmento pequeno e com 10.000 cópias do genoma. Devido à fácil contaminação e alta probabilidade de reação cruzada, impedindo um diagnóstico conclusivo, as amostras previamente positivas foram testadas em nova reação de PCR (*Leishmania* SSUrDNA) para a família Trypanosomatidae (RNA ribossomal), segundo Garcez et al. (2009). Na PCR-SSUrDNA, a reação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient; Eppendorf, Hamburg, Germany) sob as seguintes condições: Mix total de 50µl (Taq DNA polymerase 0.02U/µL; MgCl₂ 2.0mM; dNTPs 0.2mM; KCl Fermentas EP401; cada *primers* (S4 e S12 ou S17, e S18 – **Tabela 1**) 0.2mM; e 2.0µL de amostra). O DNA era desnaturado a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e extensão inicial a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Uma segunda PCR (Nested-PCR) foi realizada com os pares de *primers* S17 e S18, utilizando o produto submetido (1µl) na primeira reação, sob as mesmas condições anteriores.

3.5 Leitura e análises dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR, 10µl de DNA de cada amostra amplificado acrescido de 3 µl de corante (Gel Loading Buffer – Invitrogen®), foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) à 110v/50mA. Após a corrida, o gel era corado com brometo de etídio (0,5µl/ml – Invitrogen®) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphamager®). As amostras que revelavam bandas de DNA na altura do controle positivo eram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada (**Figura 3**).

Figura 3 – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta. PCR para *Babesia* spp. Amostras de baço de cachorro-do-mato onde as amostras 11, 14, 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 28 e 29 foram consideradas positivas. C+: controle positivo; C-: controle negativo; CM: controle do mix; **: livre de amostra

3.5.1 Seqüenciamento

As amostras positivas foram purificadas utilizando-se ExoSAP-IT (USB® Corporation) conforme instruções do fabricante (3µl de ExoSAP e 7,5 µl de DNA amplificado), e, submetidas ao seqüenciamento de DNA utilizando o “Kit Big Dye 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 seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem, Foster, CA), disponível no Departamento da FMVZ/USP, seguindo-se recomendações do fabricante.

3.5.2 Análise Filogenética

As seqüências obtidas foram editadas em computador pelo programa de Software SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, Wis.), e submetidas a análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST two sequences analysis*) (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com seqüências correspondentes disponíveis no GenBank, e desta forma, efetuar a identificação genética dos produtos amplificados nas amostras testadas.

Todas as seqüências obtidas em cada reação foram submetidas a análises filogenéticas no programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007). Cada cromatograma foi alinhado automaticamente com outras seqüências disponíveis no GenBank, usando o algoritmo Clustal W. Para cada gene avaliado foi construída uma árvore filogenética empregando-se o método de *Neighmor-joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). O intervalo de confiança para cada ramo da árvore foi determinado com análises de “bootstrap” com 1000 reamostragens.

3.6 Outras análises

3.6.1 *Borrelia* sp

Para verificar a presença de DNA de bactérias do gênero *Borrelia*, as amostras foram testadas com um par de *primer* FlaLL senso e FlaRL anti-senso externos (**Tabela 2**) que amplificam 665-bp do gene *flagelina-B* (*Flab*), e uma segunda reação utilizando um par de *primer* FlaLS senso e FlaRS anti-senso internos (Nested-PCR), que amplificam um fragmento de 354-bp, de acordo com Stromdahl et al. (2003).

As duas reações de amplificações, PCR e *Nested-PCR*, foram realizadas segundo Spolidorio (2009), com modificações. Na primeira reação a amplificação foi feita em

microtubos de 200 µl com volume total de 25 µl de Mix contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. Para a segunda reação (Nested-PCR), foram utilizados 1 µl de amostras (DNA) amplificadas na primeira reação. Para cada reação foram utilizados controle positivo (*Borrelia anserina*) e controle negativo (água livre de DNA).

As reações de ampliações foram processadas em aparelho termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf®), de acordo com Spolidorio (2009). Nas duas reações a sequência térmica utilizada foi: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C, com extensão inicial a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 – Listas de *primers* utilizados na detecção de outros agentes pesquisados

<i>Pares de primers e gene alvo</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Seqüência dos primers (5' → 3')</i>	<i>Fragmento amplificado (bp)</i>	<i>Referência</i>
<i>Flab</i>	<i>Borrelia</i> spp		665 bp	<i>Stromdahl et al., 2003</i>
FlaLL		F- ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT		
FlaRL		R- GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT		
			354 bp	
FlaLS		F- AACAGCTGAAGAGCTTGGAAT		
FlaRS		R- CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
<i>CAPI</i>	<i>Coxiella</i> spp		601 bp	<i>Reeves et al., 2006</i>
CAPI-844F		F- ATTTAGTGGGTTTCGCGCAT		
CAPI-844R		R- CATCAGCATACGTTTCGGGAA		

3.6.2 *Coxiella* sp.

Todas as amostras foram testadas para a presença de *Coxiella*, utilizando-se um par de *primers* CAPI-844-F senso e CAPI-844-R anti-senso (**Tabela 2**), que amplificam um fragmento de 601-bp do gene *CAPI* (*capsular polysaccharide biosynthesis protein*) (REEVES et al., 2006).

A reação de amplificação foi feita em microtubos de 200µl adicionando 2,5µl de DNA extraído, 2,5µl de Buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl, Invitrogen®), 0,75µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen®), 0,15µl de Taq Polimerase (Invitrogen®), 4,0µl de dNTP (Invitrogen®), 1,25µl de cada *primer* e 12,6µl de água miliqui, totalizando um volume de 25µl de Mix por microtubo. Para cada reação, foram utilizados controle positivo (*Coxiella burnetti* de cultivo celular – COX Atg 5p) e controle negativo (água). A amplificação foi processada em aparelho termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf®), de acordo com Widmer (2009). Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidas de 40 ciclos que consistiram em 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, extensão inicial a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

4 RESULTADOS

Neste item, algumas técnicas foram agrupadas para facilitar a exposição dos dados e também devido ao fato de algumas apresentarem o mesmo resultado.

4.1 Identificação dos carrapatos

Foram coletados um total de 25 carrapatos, provenientes de onze (11) animais (**Anexo A**), o que resulta em uma taxa de infestação de 18,96% (11/58). Todas as espécimes de carrapatos foram identificadas como ninfas de *Amblyomma cajennense*.

4.2 Coleta de Material e Extração de DNA

Dos 60 animais necropsiados, dois (02) apresentavam-se em grau avançado de autólise, não havendo possibilidade de coleta de material para análise molecular, totalizando assim um “n” de 58 animais. Dos 58 cachorros-do-mato, 48,27% (28/58) eram machos e 51,72% (30/58) eram fêmeas (**Figura 4**). Todos os animais foram mortos entre os anos de 2004 a 2009, entre os quilômetros 10 a 53 km da rodovia ES-060.

A extração do DNA foi realizada em 41 amostras de baço, onze (11) de pulmão e seis (06) de sangue (**Anexo B**). Cada amostra corresponde a um animal, totalizando 58 animais pesquisados. As amostras utilizadas continham aproximadamente 100 ng/μl de DNA extraído.

Figura 4 – Gráfico com distribuição anual relacionadas ao sexo e resultados pela técnica da PCR nas amostras de *Cerdocyon thous* avaliadas, positivos para *Hepatozoon* spp (■/□) e *Ehrlichia* spp (▨)

4.3 Reação em Cadeia de Polimerase

Os protocolos para cada reação de PCR empregadas encontram-se detalhadas a seguir, separadas pela especificidade para cada agente.

4.3.1 Família Anaplasmataceae e *Ehrlichia* spp

Das 58 amostras testadas na PCR para a família Anaplasmataceae (16S ribossomal), seis foram positivas (B9, B20, B31, B36, B40 e B41), quatro animais do

sexo masculino (66,6%) e dois femininos (33,3%). Todas as amostras foram seqüenciadas e submetidas ao BLAST.

Somente a amostras B20 gerou um fragmento de 293-bp, nomeada *Ehrlichia* sp ex. *Cerdocyon thous* (**Figura 5**), com 97,57% (282/289) de similaridade com *E. ruminantium* (DQ482915), *E. ruminantium* cepa *Gardel* (CR925677), *E. ruminantium* cepa *Welgevonden* (CR925678 e CR767821), *Cowdria ruminantium* (X62432), *Cowdria* sp “South African canine” (AF325175), 97,22% (280/288) de similaridade com *E. chaffeensis* (AY350424; U86665); 96,87% (279/288) com *E. canis* (GU810149; GU386289; EU178797; EF195135; EF139458) e 95,56% (281/288) de similaridade com *E. ewingii* (M73227). Das outras cinco amostras, quatro geraram uma seqüência 100% similar com *Clostridium* sp. (FM877592), e uma (B41) não gerou seqüência de qualidade no seqüenciamento.

Para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp, seis amostras foram positivas (B10, B11, B18, B19, B20 e B41), incluindo a amostra positiva para 16S para família Anaplasmataceae (B20). O produto das amostras foi seqüenciado e gerou um fragmento de 328-bp do gene *dsb* nomeada como *Ehrlichia* sp ex. *Cerdocyon thous* (**Figura 6**), que apresentou 82,51% (269/326) de similaridade com *E. ruminantium* cepa *Gardel* (CR925677), 82,2% (268/326) com *E. ruminantium* cepa *Welgevonden* (CR925678 e CR767821), e *Cowdria ruminantium* (AF308669), 79,17% (251/317) de similaridade com *Ehrlichia* sp Anan (AY236485), 78,54% (2749/317) com *E. muris* (EU919250), 78,19% (251/321) similar com *E. canis* (GU586135; DQ460716; DQ460715), 76,58% (229/299) com *E. ewingii* (DQ902688; DQ151999), e, 76,34% (249/326) com *E. chaffeensis* (EF375886; CP000236; AF403711) (**Figura 6**).

A prevalência de infecção por *Ehrlichia* spp foi de 10,34% (6/58). Dos seis animais positivos, três (50%) eram machos e três fêmeas (50%). Dois animais foram mortos no quilômetro 32 km (B18, B20) no ano de 2005, dois no quilômetro 53 km (B10, B11) em 2005, e um no quilômetro 39 km (B19), no ano de 2004. O animal B41 foi encaminhado vivo ao laboratório no ano de 2009, sem informações quanto à localização de origem.

Todas as amostras de carrapatos foram negativas na PCR para a família Anaplasmataceae (gene 16S) e *Ehrlichia* spp (gene 16S e *dsb*).

Figura 5 - Árvore filogenética de *Ehrlichia* sp. de *Cerdocyon thous* (vermelha) mostrando a relação entre outras espécies de *Ehrlichia*, baseada em seqüências de fragmentos do gene 16S rRNA. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio

Figura 6 - Árvore filogenética de *Ehrlichia* sp. de *Cerdocyon thous* (vermelha) mostrando a relação entre outras espécies de *Ehrlichia*, baseada em seqüências de fragmentos do gene *dsb*. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio

4.3.2 *Hepatozoon* sp e *Babesia* sp

Na PCR para *Hepatozoon* (gene 18S rRNA), onze (11) amostras foram positivas (B9; B24; B28; B29; B30; B40; B41; S2; P12; P20; P46) e seqüenciadas. Todos os produtos foram analisados, alinhados e submetidos ao BLAST. Dez amostras obtiveram um fragmento de 576-bp com 99% (719/726) de similaridade com *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377), nomeada *Hepatozoon* sp ex. *Cerdocyon thous* (**Figura 7**).

Uma amostra, proveniente de um fragmento de pulmão (P20), positiva no PCR para *Hepatozoon* spp, gerou um fragmento de 604-bp, 97,5% (589/604) similar ao *Hepatozoon* sp 744C (EU430234), nomeada *Hepatozoon* sp. P20 *Cerdocyon thous* (**Figura 7**) e somente 91% de similaridade com *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377).

Na PCR para *Babesia* spp (gene 18S), 25 amostras foram positivas (B1; B3; B6; B7; B8; B11; B14; B15; B16; B18; B19; B23; **B24**; B25; **B28**; **B29**; B31; B36; B39; **B40**; **B41**; S17; **P12**; P13; **P46**), sendo que dentre estas, sete também foram positivas na PCR para *Hepatozoon* (em itálico e negrito). Todos os produtos foram seqüenciados, gerando um fragmento de 318-bp. Na análise gênica de similaridade, todas apresentaram 98% de similaridade com *Hepatozoon* sp curupira 2 (AY461377).

No total, foram identificados 29 animais positivos (50% [29/58]) para *Hepatozoon* spp, 25 (83,33%) detectados pela técnica de PCR para *Babesia* spp e 10 (33,33) para *Hepatozoon* spp. Duas variações de *Hepatozoon* foram encontradas, *Hepatozoon* sp 744C (EU430234) prevalente em 1,72% (1/58) na população avaliada, e *Hepatozoon* sp Curupira 2 (AY461377), prevalente em 48,27% (28/58). Dos 29 animais positivos 55,17% (16/29) eram machos e 48,27% (14/29) fêmeas. Todos os animais positivos foram mortos entre o quilômetro 10 a 53 km, com maior ocorrência entre o quilômetro 20 a 40 km.

Por se tratar do mesmo gene avaliado e o resultado de similaridade ter sido semelhante para o gene 18S rRNA, os nucleotídeos obtidos no seqüenciamento das 28 amostras (exceto a P20), proveniente das duas PCR (*Hepatozoon* e *Babesia*),

foram alinhados. Para tanto, dois novos pares de *primers* para o gene 18S de *Babesia* spp (BAB2) e outro para *Hepatozoon* spp (HEP2) foram desenhados (**Tabela 1**).

Todas as amostras testadas na segunda PCR para *Babesia* (BAB2) foram negativas, ao passo que para *Hepatozoon* (HEP2), as 10 amostras positivas anteriormente foram detectadas. Os produtos da segunda PCR de *Hepatozoon* foram seqüenciados e alinhados juntamente com os produtos da primeira reação de *Babesia* e *Hepatozoon*. O alinhamento gerou um fragmento total de 1060-bp do gene 18S rRNA.

Esse novo alinhamento foi submetido ao BLAST e obteve uma similaridade de 98,67% (1040/1054 com 1 gap) com *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377), 97,6% (1038/1063 – 9 gaps) com *Hepatozoon americanum* (AF176836), 94,3% (993/1053) de similaridade com *H. felis* (AY628681; AY620232), 93,6% (988/1055) de similaridade com *H. canis* isolado curupira 3 e 4 (AY461375; AY471615) e 93,5% com *H. canis* isolado de Venezuela (DQ439540) (**Figura 7**).

Nenhuma espécime de carrapato testada foi positiva na PCR para *Hepatozoon* spp e *Babesia* spp, gene 18S rRNA.

Figura 7 - Árvore filogenética de *Hepatozoon* sp P20 (vermelha) e *Hepatozoon* sp. *Cerdocyon thous* (negrito) demonstrando a relação entre outras espécies de *Hepatozoon*, baseada em seqüências de fragmentos do gene 18S rRNA. Em verde, espécies encontradas no Brasil (N-J, bootstrap 1000). A barra de escala representa o número de substituição por sítio

4.3.3 *Leishmania* spp e *Rickettsia* spp

Todas as amostras de tecidos e sangues dos cachorros-do-mato, quanto os carrapatos, foram negativas na PCR para detecção de *Leishmania* e *Rickettsia*.

4.3.4 *Coxiella* sp e *Borrelia* spp

Todas as espécimes de carrapatos e animais foram negativos para *Coxiella* sp e *Borrelia* spp.

5 DISCUSSÃO

O carrapato *Amblyomma cajennense* é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, que parasita uma variedade de animais domésticos, silvestres e o homem (ARAGÃO, 1936). A única espécie encontrada na população de cachorro-do-mato avaliada foi *A. cajennense*, já relatada em cachorro-do-mato por Labruna et al. (2005). A baixa quantidade de carrapatos coletados nos animais (13,79%), e até mesmo a ausência de indivíduos adultos, provavelmente está associada ao desprendimento natural de espécimes logo após a morte do hospedeiro. A ausência de outras espécies de carrapatos nos animais estudados não implica que o *A. cajennense* seja o único carrapato a parasitar o cachorro-do-mato na região, e também não descarta a possibilidade de existirem uma ampla diversidade de carrapatos na região de coleta dos animais.

Borrelia burgdorferi sesu lato são bactérias transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* e que causam a doença conhecida por Doença de Lyme que acomete animais e seres humanos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005), com casos suspeitos no Brasil, somente com diagnóstico sorológico e histopatológico, sem isolamento do agente (MANTOVANI et al., 2007). Segundo Yoshinari et al. (2010), as possíveis espécies de carrapatos associadas à transmissão da doença de Lyme no Brasil seria o *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus* e em destaque o *Amblyomma cajennense*. Apesar de existirem casos suspeitos de Borreliose no Brasil, incluindo o estado do Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), nenhum animal, ou mesmo carrapato (*A. cajennense*), obteve resultado positivo na pesquisa para *Borrelia* spp, o que não elimina a chance de ocorrência deste agente infectando outras espécies de animais na região.

A febre Q é uma doença zoonótica causada pela *Coxiella burnettii*, transmitida aos animais por carrapatos e para o homem através de aerossóis e contato com leite, fezes e urina contaminada (PAROLA; ROUOLT, 2001; KAZAR, 2005). No Brasil há relatos de casos nos Estados de Minas Gerais (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2005), São Paulo (SICILIANO et al., 2008) e Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2009), com recente diagnóstico molecular de *Coxiella burnettii* (LEMOS et al., 2010). Mesmo com a ocorrência destas bactérias no país, nenhum animal apresentou

resultado positivo, o que é sustentado pelo fato de que este agente, até a presente data, não foi relatado em canídeos silvestres.

Babesiose é uma doença mundialmente distribuída, causada por um hemoprotozoário transmitido por carrapatos, com capacidade de infectar animais e humanos (ALMOSNY, 2002; TABOADA; LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009). Embora *Babesia* sp seja um agente amplamente distribuído no Brasil e constantemente diagnosticada em cães domésticos (DANTAS-TORRES, 2008a), inclusive no estado do Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), e em canídeos silvestre (SERRA-FREIRE et al., 1993; RUAS et al., 2003; MARTINS et al., 2006; BIRKENHEUER et al., 2010), o presente trabalho não detectou nenhum animal infectado com esse agente.

A ausência de infecção por *Babesia* pode ser sustentada pelo fato de que o carrapato transmissor deste hemoprotozoário no Brasil, *Rhipicephalus sanguineus* (TABOADA; LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009), não foi encontrado parasitando nenhum cachorro-do-mato estudado, somente a espécie *Amblyomma cajennense*, sabidamente reconhecido como vetor de outros agentes, mas não de *Babesia* sp.

Até a presente data não há comprovação molecular de infecção natural por *Babesia* spp em *Cercyon thous*, somente um caso suspeito com diagnóstico por visualização do agente em esfregaço de sangue (PARAENSE; VIANNA, 1948), o que não comprova se tratar verdadeiramente de infecção por protozoários do gênero *Babesia*. Outro fator importante é quanto à susceptibilidade desta espécie de canídeo à *Babesia* sp. Casos de resistência a infecção por determinados agentes como *Ehrlichia* já foram relatadas em outras espécies de canídeos silvestres (DAVIDSON et al., 1999).

Rickettsia é um gênero de bactérias que causam diversas doenças de importância na saúde pública, sendo a principal relatada no Brasil a Febre Maculosa Brasileira, causada pela *R. rickettsii*, transmitida pela picada do carrapato (LABRUNA et al., 2009). No Brasil as espécies de carrapatos conhecidas por transmitirem essa bactéria são o *Amblyomma cajennense* e *A. aureolatum* (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006).

No presente estudo, nenhum animal foi positivo para *Rickettsia*, mesmo com a ocorrência do carrapato vetor (*A. cajennense*) em uma moderada prevalência (13,79% [8/58]) nos animais estudados. Atualmente, somente casos sorológicos de Riquetisioses foram relatados em canídeos silvestres, sem confirmação molecular (BISCHOF; ROGERS, 2005; CAMER; LIM, 2008). Estes resultados não excluem a possibilidade deste agente ocorrer na área do estudo ou mesmo em outras espécies de canídeos, pois atualmente são relatadas várias notificações de Febre Maculosa no estado do Espírito Santo (SEXTON et al., 1993; SES, 2010).

Leishmaniose é uma zoonose considerada endêmica em algumas regiões do país como Nordeste do Maranhão (REY, 1991). Existem dois tipos de manifestações clínicas associadas ao agente, a leishmaniose visceral, causada pelo complexo *Leishmania donovani* (*Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*), e Leishmaniose tegumentar pode ser causada por *L. (viannia) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis* e *L. (V) amazonensis* (QUINNELL; COURTENAY, 2009; DAVID; CRAFT, 2009).

O cachorro-do-mato é considerado um reservatório silvestre da leishmaniose visceral com elevada incidência (74%) no Maranhão (COUTERNAY, 2002). Interessantemente, nenhum animal avaliado foi detectado positivo para *Leishmania* spp pela técnica de PCR para a família Tripanosomatidae (SSUrDNA) ou na PCR específica para kinetoplasto (kDNA). Este resultado pode ser justificado pela ausência de casos humanos e caninos de Leishmaniose visceral desde 2002 no estado do Espírito Santo (BRASIL, 2005). Estes dados sugerem que não há circulação de *Leishmania* do complexo *donovani* na região avaliada.

Erlíquiose é uma doença causada por bactérias intracelulares que infectam animais e humanos em todo o mundo (DUMLER et al., 2001). Esse agente é transmitido principalmente pelo carrapato *Amblyomma americanum* (na América do Norte) e *Rhipicephalus sanguineus* (no Brasil) (DANTAS-TORRES, 2008a). Nesta pesquisa foram detectados seis animais infectados com *Ehrlichia* sp que apresentaram uma máxima similaridade de 97,57% (para o gene 16S) e 82,51% (para o gene *dsb*) com as demais espécies de *Ehrlichia* depositadas no GenBank, sugerindo assim se tratar de uma nova espécie desse gênero.

Infecção por bactérias do gênero *Ehrlichia* já foram relatadas por testes sorológicos em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (FISHMAN et al., 2004), sem detecção molecular deste agente até a presente data, sendo este resultado o primeiro a detectar, por técnicas moleculares, bactérias do gênero *Ehrlichia* em canídeos silvestres, que neste caso refere-se ao cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre.

As seqüências gênicas foram mais próximas de *Ehrlichia ruminantium*, agente causador da doença conhecida como “heartwater”, que infectam bovinos, ovinos, caprinos e ungulados silvestres de distribuição restrita à África e África subsaariana (GREEN, 2006; ALLSOPP, 2010). No Brasil não há relatos deste agente e seus principais vetores, *Amblyomma variegatum* e *Amblyomma haebreum*, também não são relatados no Brasil (GUGLIELMONE et al., 2006).

A transmissão da erliquiose ocorre pela picada do carrapato (DANTAS-TORRES, 2008a), havendo associação entre a espécie da bactéria envolvida e seu vetor. A única espécie de carrapato encontrada nos animais avaliados foi *A. cajennense*, que apesar de haver estudos experimentais de que *Ehrlichia ruminantium* possa ser transmitida por este carrapato (WALKER; OLWAGE, 1987), ainda não foi vinculado a transmissão natural de erliquiose por ele, o que dificulta a especulação da possível via de infecção destes animais.

Em trabalho publicado por Allsopp e Allsopp (2001), foi diagnosticada infecção por uma nova espécie de *Ehrlichia*, similar a *Cowdria ruminantium* em cães da África. A seqüência gênica elaborada neste trabalho (AF325175) foi comparada aos presentes resultados, sendo a similaridade entre eles de 97,57% para o gene 16S (**Figura 5**).

Anaplasmosose é uma doença que acomete animais e humanos (DUMLER et al., 2001), sendo o *A. platys* amplamente distribuído na população canina brasileira (DANTAS-TORRES, 2008a). Nenhum animal estudado foi positivo quanto à presença de agentes do gênero *Anaplasma*. Quatro amostras positivas na PCR para a família Anaplasmataceae (gene 16S) obtiveram resultado 100% similar a *Clostridium* sp, o que provavelmente está associado à contaminação durante o processo de decomposição da carcaça.

Hepatozoonse é uma doença causada por um hemoprotozoário que infecta animais domésticos e silvestres em todo o mundo (EWING; PANCIERA, 2003). Detecção molecular e sorológica de *Hepatozoon* sp infectando canídeos silvestres são relatadas nas Américas, Europa, Ásia, e África (ALMOSNY, 2002). Os relatos de infecção por *Hepatozoon* em *Cerdocyon thous* no Brasil é principalmente pela espécie *H. canis* e *Hepatozoon* sp (ALENCAR; KOHAYGAWA; SANTARÉM, 1997). Neste trabalho 50% (29/58) dos animais estudados foram positivos para a presença de *Hepatozoon* sp, tendo sido encontradas duas espécies distintas, uma 98,67% similar com *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377), nomeada *Hepatozoon* sp. *Cerdocyon thous*, prevalente em 96,55% (28/29) dentre os animais positivos (**Figura 7**), e outra 97,5% similar com *Hepatozoon* sp. 744C (EU430234), encontrada somente em um animal (3,44% [1/29]), nomeada *Hepatozoon* sp. P20 *Cerdocyon thous* (**Figura 7**).

Hepatozoon sp curupira 2 foi primariamente diagnosticado em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) do Rio Grande do Sul, Brasil (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). Pesquisa recente demonstra infecção por uma nova espécie de *Hepatozoon* 86% similar com *Hepatozoon* sp. curupira 2 (AY461377), também em *Cerdocyon thous* no Brasil (ANDRÉ et al., 2010). Semelhante ao trabalho de André et al. (2010), nossas amostras foram similares a *Hepatozoon* sp. curupira 2. A comparação entre estes resultados com o observado pelos autores não foi possível, pois as seqüências geradas por estes pesquisadores não estavam disponíveis no Genbank até a presente data. A espécie de *Hepatozoon* sp. 744C (EU430234) foi detectada em carrapato *Amblyomma* de répteis da Austrália (VILCINS et al., 2009), sendo este trabalho o primeiro a relatar a ocorrência de um geótipo similar a este, em canídeos silvestres.

Através dos resultados do presente trabalho, juntamente com os observados por André et al. (2010) e Criado-Fornelio et al. (2006), podemos concluir que existem no mínimo quatro diferentes populações de *Hepatozoon* infectando cachorros-do-mato no Brasil. Pela localização geográfica dos animais mortos positivos no presente estudo, observa-se que os agentes detectados encontram-se amplamente distribuídos na área avaliada, que estende do quilômetro 10 ao 53 km da Rodovia do Sol.

A taxa de infecção observada na população de canídeos é maior que a observada em outros canídeos silvestres (GIMENEZ et al., 2009; ANDRÉ et al., 2010), sendo semelhante à prevalência em cães domésticos no país (KARAGENC et al., 2006; RUBINI et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010). A elevada prevalência de animais positivos para hepatozoonoses em nossa pesquisa demonstra que este agente encontra-se amplamente distribuído na população de cachorro-do-mato, e com capacidade de se manter e se difundir na população, o que provavelmente está associado à presença do carrapato *Amblyomma cajennense*, um dos prováveis transmissores de hepatozoonose canina no Brasil (RUBINI et al., 2008).

A transmissão da hepatozoonose se dá pela ingestão do carrapato infectado (DANTAS-TORRES, 2008a), que no caso do cachorro-do-mato, pode ocorrer pela predação de pequenos animais parasitados por carrapatos ou mesmo no comportamento de auto-limpeza e mordedura no local da picada do carrapato.

Estes resultados demonstram a alta susceptibilidade desse canídeo à infecção por *Hepatozoon* sp e sugerem que, como relatado em algumas espécies de animais, o cachorro-do-mato aja como um reservatório do agente sem manifestações clínicas, o que é freqüentemente observado nos animais silvestres (METZGER et al., 2008), e revelam uma adaptação desses animais a este agente, pois a população estudada apresentava-se em boas condições corporais, sem alterações físicas que sugerissem a ocorrência de alguma doença debilitante.

6 CONCLUSÃO

- Os agentes pertencentes aos gêneros *Hepatozoon* e *Ehrlichia* encontrados neste trabalho provavelmente tratam-se de novas espécies, nunca antes relatadas nas Américas.
- Este é o primeiro relato molecular de Ehrlichiose em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).
- Mesmo havendo uma alta prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp (48,27%) nestes animais e dois casos de *Ehrlichia* sp, pode-se concluir que a reserva onde estes animais habitam se encontra em boas condições sanitárias para *C. thous* e o contato destes animais silvestres com outros animais domésticos é baixo, por apresentarem ausência de agentes comuns às regiões peri urbanas, tais como *Babesia canis*, *E. canis*, *Leishmania donovani* e *Anaplasma platys*, e também por apresentarem boas condições corporais.

REFERÊNCIAS

- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WANG, G.; SCHWARTZ, I.; WORMSER, G. P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 484–509, 2005.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, p. 11-29, 1983.
- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V. A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 279-282, 1997.
- ALLSOPP, B. A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 123-135, 2010.
- ALLSOPP, M. T. E. P.; ALLSOPP, B. A. Novel Ehrlichia Genotype Detected in Dogs in South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4204–4207, 2001.
- 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. 202p. (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.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R. OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H. Detection of the etiologic agent of human Ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. ½, p. 134-138, 2010.

ANGERAMI, R. N.; DA SILVA, A. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; DOS SANTOS F. C.; MANCINI, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; DA SILVA, L. 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. **Clinical Microbiology Infection**, v. 15, p. 207-208, 2009.

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

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, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Agentes Rickettsiais de doenças animais; as Riquetsias. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-275.

BIRKENHEUER, A. D.; HORNEY, B.; BAILEY, M.; SCOTT, M.; SHERBERT, B.; CATTO, V.; MARR, H. S.; CAMACHO, A-T.; BALLMAN, A. E. *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3/4, p.179-182, 2010.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Vigilância em Saúde - Espírito Santo**. 1 ed. Brasília-DF. 2005, 19p.

BRASIL. Secretaria do Estado da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555. Acesso em: 21 jul. 2010.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDOFER, W.; COBERTT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTINS, 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, p. 70-76, 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

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.

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

CATENACCI, L. S.; GRIESE, J.; SILVA, R. C. LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1/2, p. 190-192, 2010.

CERQUEIRA, E. J. L.; SILVA, E. M.; MONTE-ALEGRE, A. F.; SHERLOCK, I. A. Consideração sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cerdocyon thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 91-93, 2000.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 853-859, 2005.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Questing one Brazilian Query: Reporting 16 Cases of Q Fever from Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 5-9, 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**, n. 86, p. 257-260, 2009.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; CHALMERS, W. S. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 9-19, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, Pt.5, p. 407-414, 2002.

COURTENAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 498-502, 1996.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p.149-155, 2005.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, Impresso, 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.

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

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491-592, 2009

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.

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

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of

Ehrlichia equi and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.

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

FARREL, J. P. (ed.). **World class parasites Leishmania**. USA: Kluwer Academic Pub, 2002. v.4, p. 193.

FISHMAN, Z.; GONENA, L.; HARRUS, S.; STRAUSS-AYALI, D.; KING, R.; BANETH, G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 21–26, 2004.

FORLANO, M. 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.

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.

FOWLER, M. E.; MILLER, E. R. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5. ed. St. Louis, Missouri. Elsevier Science (USA); Saunders, 2003. p. 482-491.

GABRIEL, M. W.; BROWN, R. N.; FOLEY, J. E.; HIGLEY, J. M.; BOTZLER, R. G. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 2, p. 344–354, 2009.

GARCEZ, L. M.; SOARES, D. C.; CHAGAS, A. P.; SOUZA, G. C. R.; MIRANDA, J. F. C.; FRAIHA, H.; FLOETER-WINTER, L. M.; NUNES, H. M.; ZAMPIERE R. A.; SHAW, J. J. Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthropophilic vectors in Juruti, Pará State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 10, p. 2291-2295, 2009.

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.

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.

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

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.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical (BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H.). São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. p.131-138.

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

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.

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

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

ISOGAL, E.; LSOGAI, H.; KAWABATA, H.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; KIMURA, K.; SAKAI, T.; AZUMA, Y.; FUJII, N.; OHNO, S. Lyme Disease Spirochetes in a Wild Fox (*Vulpes vulpes schrencki*) and in Ticks. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 439-444, 1994.

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

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

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

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.

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

LABRUNA, M. B.; 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.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

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, 2007b.

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

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LAMAS, C. C.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; FAVACHO, A. R. M.; KIRSTEN, A. H.; SILVA, A. P. M.; LEMOS, E. R. S. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.140–141, 2009. Supplement 2.

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.

LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M. A. M.; ALMEIDA, D. N. P.; MOREIRA, N.; SILVA, R. G.; BARREIRA, J. D.; LAMAS, C. C.; FAVACHO, A. R.; DAMASCO, P. V. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *coxiella burnetii* in brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2010. (No prelo).

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

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

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

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

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

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio**

Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGAEA, 2002. 52 p. (Publicações Avulsas FZB, 11).

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

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

MARTINS, T. F.; CUROTTO, S. M. R.; SILVA, F. M. P.; TEIXEIRA, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S. *Ancylostoma* sp. e *Babesia* sp. associada 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. In: **Congresso da Sociedade Paulista de Zoológicos**, 15; 2006.

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

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

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.

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

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

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.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B; BARBOSA S. O; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA M.

B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 9, p. 73-78, 2009.

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.

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.

NIETO, N. C.; LEONHARD, S.; FOLEY, J. E.; LANE, R. S. Coinfection of Western Gray Squirrel (*Sciurus griseus*) and other Sciurid Rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 291–296, 2010.

O'DWYER, L. H; MASSARD, C. L; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 143-150, 2001.

OHASHI, N.; INAYOSHI, M.; KITAMURA, K.; KAWAMORI, F.; KAWAGUCHI, D.; NISHIMURA, Y.; NAITOU, H.; HIROI, M.; MASUZAWA, T. *Anaplasma phagocytophilum*–infected Ticks, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1780-1783, 2005.

OLANO, J. P. Rickettsial infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 187-196, 2005.

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.

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

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

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia 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.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

REBÊLO, J. M. M.; LEONARDO, F. S.; COSTA, J. M. L.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estados do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 623-630, 1999.

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

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

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

REHN, F. Experimental Q Fever infection of fox (*Vulpes vulpes*) and of forest mouse (*Apodemus flavicollis*). **Ceskoslovenská Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie**, v. 7, n. 5, p. 317-320, 1958.

REY, L. Leishmania e leishmaniose: parasitos. In:___ REY, L. **Parasitologia**. (2. ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 182-192.

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.

- RODRIGUES, A. S. F. S.; DAEMON, E. Ixodídeos e Sifonápteros em *Cerdocyon thous* L. (carnívora, canídea) procedentes da zona da mata mineira, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 371-372, 2004.
- RUAS, J. L.; FARIAS, N. A. R.; SOARES, M. P.; BRUM, J. G. W. *Babesia* sp em Graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) no sul Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 70, n. 1, p. 113-114., 2003.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, p. 91–93, 2005.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; LOPES, V. A.; O'DWYER, L. H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 895-899, 2008.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; PEREZ, R. R.; RIBOLLA, P. E. M.; O'WYER, L. H.; Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 168-171, 2006.
- SAHNI, S. K.; RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. **Future Microbiology**., v. 4, p. 323-339, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- 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.2 65-270, 2005.
- SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 18-24, 2009.
- SCOLA, B. L. Current Laboratory Diagnosis of Q Fever. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 257-262, 2002.
- SERRA-FREIRE, N. M.; TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM, A.; GAZÊTA, G. S.; NUNES, A. L. V.; YADA, H. S.; TEIXEIRA, C. **Babesiose associada ao parasitismo por carrapatos em Lobo guará**. In: Congresso Brasileiro de Zoológicos, 1993, São Paulo. Anais... São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil., 1993. 161 p.
- SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; DUMLER S.; WALKER, D. H.; PECANHA, 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.

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

SILVA, E. S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C. M.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Veterinary Record**, v. 147, n. 15, p. 421-422, 2000.

SILVA, F. L.; RODRIGUES, A. A. M.; REGO, I. O. P.; SANTOS, R. L. H.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesion and distribuion of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 86-90, 2008.

SILVA, J. C. P.; VILORIA, M. I. V. (2000). **Necropsia em medicina veterinária**. Viçosa: UFV, 2000. 36 p. (Caderno Didático, n.77).

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

SOUZA, B. M. P. S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; GONDIM, L. F. G.; FRANKE, C. R. Prevalence of *Ehrlichial* infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010a.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FREITAS, T. P. T.; PAZ, R. C. R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 333-335, 2010b.

SPOLIDORIO, M. G. Perfil Sorológico e Molecular de zoonoses transmitidas por carrapatos em humanos e animais domésticos oriundos de seis municípios do Estado do Espírito Santo. 2009. 76p. (Tese-Doutorado) – **Faculdade de Medicina da Universidade Universidade de São Paulo**, 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.

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.

STROMDAHL, E.; WILLIAMSON, P.; KOLLARS, T.; EVANS, S. R.; BARRY, R. K.; VINCE, M. A.; DOBBS, N. A. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C. Z.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16s ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90-93, 2001.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

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.

ULIANA, S. R. B.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst *Leishmania* by Polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

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.

VILCINS, I. M.; UJVARI, B.; OLD, J. M.; DEANE, E. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 434-442, 2009.

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

WALKER, J. B.; OLWAGE, A. The tick vertos of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. **The Onderstepoort Journal Of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 353-379, 1987.

WIDMER, C. E. **Perfil sanitário de onças-pitadas (*Panthera onca*) de vida livre do Pantanal Sul Mato Grosso do Sul – Brasil**. 2009. 89p. (Dissertação: Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WOLDEHIWET, Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 93–100, 2004.

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G. Doença de lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

ZUBIRI, C. S. HOLFMANN, M.; MACDONALD, D. W. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. In: COURTENAY, O.; MAFFEI L (Org.). **Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766)**. 1. ed. Switzerland and Cambridge, UK. Canid Action Plan, 1990. p. 32-38.

ANEXO A – Lista dos animais infestados por carrapatos, quantidade por animal e espécie identificada de carrapato.

IDENTIFICAÇÃO	ESPÉCIE	ECTOPARASITA	QUANTIDADE	SPP
SM-09	Cachorro-do-mato	Carrapato	2 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-10	Cachorro-do-mato	Carrapato	8 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-12	Cachorro-do-mato	Carrapato	3 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-13	Cachorro-do-mato	Carrapato	1 ninfa	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-14	Cachorro-do-mato	Carrapato	2 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-15	Cachorro-do-mato	Carrapato	4 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-16	Cachorro-do-mato	Carrapato	3 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>
SM-17	Cachorro-do-mato	Carrapato	2 ninfas	<i>Amblyomma cajennense</i>

ANEXO B - Tabela com identificação dos animais quando recebidos para necropsia (SM-) e a identificação do material biológico coletado para análise molecular, fragmento de baço (B1-41), pulmão (P2;...) e sangue (S2;...).

IDENTIFICAÇÃO SM	IDENTIFICAÇÃO PCR – BAÇO
SM-01	B1
SM-06	B2
SM-07	B3
SM-09	B4
SM-10	B5
SM-11	B6
SM-12	B7
SM-13	B8
SM-14	B9
SM-38	B10
SM-41	B11
SM-43	B12
SM-45	B13
SM-54	B14
SM-60	B15
SM-62	B16
SM-63	B17
SM-64	B18
SM-65	B19
SM-67	B20
SM-70	B21
SM-71	B22
SM-72	B23
SM-73	B24
SM-76	B25
SM-78	B26
SM-82	B27
SM-84	B28
SM-85	B29
SM-87	B30
SM-91	B31
SM-92	B32
SM-93	B33
SM-94	B34
SM-95	B35
SM-97	B36
SM-99	B37
SM-100	B38
SM-101	B39
SM-104	B40
SM-109	B41

IDENTIFICAÇÃO SM	IDENTIFICAÇÃO PCR - SANGUE
SM-46	S2
SM-55	S5
SM-61	S7
SM-75	S17
SM-77	S18
SM-80	S20
IDENTIFICAÇÃO SM	IDENTIFICAÇÃO PCR - PULMÃO
SM-02	P2
SM-04	P3
SM-08	P6
SM-15	P11
SM-16	P12
SM-17	P13
SM-47	P18
SM-52	P20
SM-66	P27
SM-81	P35
SM-98	P46