

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/02/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR
ARTRÓPODES EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS
NA REGIÃO DO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE**

**Keyla Carstens Marques de Sousa
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR
ARTRÓPODES EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS
NA REGIÃO DO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE**

Keyla Carstens Marques de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

**Tese apresentada a Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de doutor em Medicina
Veterinária, área: Medicina Veterinária
Preventiva.**

2017

M499a Sousa, Keyla Carstens Marques de Sousa
Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes em animais selvagens e domésticos na região do Pantanal Sul Matogrossense / Keyla Carstens Marques de Sousa. -- Jaboticabal, 2017
vi, 213 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Marcos Rogério André

Banca examinadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe, Heitor Miraglia Herrera, Lúcia Helena O'Dwyer, Rosangela Zacarias Machado

Bibliografia

1. Agentes Anaplasmataceae. 2. *Bartonella* spp.. 3. Micoplasmas hemotróficos. 4. Rickettsiales. 5. *Hepatozoon* sp. 6. Piroplasmídeos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA REGIÃO DO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE

AUTORA: KEYLA CARSTENS MARQUES DE SOUSA

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. **RRERA**
Universidade Católica Dom Bosco / Campo Grande, MS



K -- !!
Prof. D. ROSANG LA ZACARIAS MACHADO
Clínica de Patologia Veterinária I FCAV I UNP - Jaboticabal

Prof. Dra. **UCIA HE E YE E A**
Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KEYLA CARSTENS MARQUES DE SOUSA – Filha de João José Marques de Sousa e Rosania Carstens Marques de Sousa, nascida em 18 de Janeiro de 1986 na cidade de Campo Grande, Mato Grosso Sul. Foi graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em dezembro de 2009. Obteve o título de mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Patologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, com a dissertação intitulada: Co-infecção por *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum chagasi* e *Babesia canis* em cães naturalmente infectados na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Em março de 2013, ingressou no curso de doutorado em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal– SP, é bolsista de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

Epígrafe

"A vida"

"Depois de muitas quedas, eu descobri que, às vezes, quando tudo dá errado, acontecem coisas tão maravilhosas que jamais teriam acontecido se tudo tivesse dado certo. Eu percebi que quando me amei de verdade pude compreender que, em qualquer circunstância eu estava no lugar certo, na hora certa.

Então pude relaxar... pude perceber que o sofrimento emocional é um sinal de que estou indo contra a minha verdade.

Parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.

Desisti de querer ter sempre razão e com isso errei muito menos vezes.

Desisti de ficar revivendo o passado e de me preocupar com o futuro. Isso me mantém no presente, que é onde a vida acontece.

Descobri que na vida a gente tem mais é que se jogar, porque os tombos são inevitáveis.

Percebi que a minha mente pode me atormentar e me decepcionar. Mas quando eu a coloco a serviço do meu coração, ela se torna uma grande e valiosa aliada. Também percebi que sem amor, sem carinho e sem verdadeiros amigos a vida é vazia e se torna amarga.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.. "

Mario Quintana

Dedicatória

Dedico e ofereço minha tese de doutorado aos meus pais João e Rosania e ao meu irmão Wagner, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram em tudo. Muito obrigada

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, por sempre me dar força na vida.

À minha mãe, meu pai e meu irmão, por me darem o apoio, estímulo e perseverança sempre que precisei

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André que abriu as portas da pesquisa acadêmica e, com muita paciência, acompanhou o desenvolvimento dos meus trabalhos. Somente com sua ajuda e seu apoio tive a oportunidade de ingressar nesta carreira. Eternamente grata.

Ao Professor Heitor Miraglia Herrera, pela amizade, valiosos ensinamentos, e pela demonstração de companheirismo e solidariedade durante todo o curso, que resultaram na conclusão desse trabalho. Eternamente grata.

A Professora Rosangela Zacarias Machado, pelos conselhos e ensinamentos de uma vida.

A Professora Mirela Tinucci Costa, por aceitar me orientar no começo do curso e por todos os conselhos e ensinamentos.

Ao meu namorado Haroldo Neves, pelos conselhos, por ter me acompanhado durante todo o meu doutorado, pela paciência e por sempre me apoiar.

Aos meus colegas de laboratório Priscila Ikeda, Priscila Preve, Jyan, Renan, Otávio, Paulo, Kayo, Simone, Inalda, Carlos, Rafaela e Luís, pela companhia prazerosa e pela amizade.

Às minhas amigas Carla Freschi e Marcia Jusi pelas alegrias, risadas e pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus colegas Filipe Martins Santos, Wanessa Teixeira Gomes Barreto, Gabriel Carvalho Macedo e João Bosco Campos, por me ajudarem nas colheitas de material no Pantanal, sempre com muita boa vontade.

À Fabiana Lopes Rocha, por me ajudar nas colheitas e pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto, pelo auxílio na identificação dos pequenos mamíferos.

Aos meus queridos amigos Tâmara e Matheus, pelas alegrias e risadas de sempre que fazem as pequenas coisas importantes na vida.

A todos meus amigos e colegas de Jaboticabal da faculdade ou não que são do convívio e nos dão forças para sempre continuar.

Aos pesquisadores Francisco Borges Costa e Thiago Fernandes Martins, pela amizade, conselhos e por toda a colaboração dada a esse trabalho.

Ao professor Marcelo Bahia Labruna e a pesquisadora Darci Barros-Battesti pelos valiosos conselhos, ensinamentos, atenção e carinho dispensados para comigo.

Aos professores Karin Werther, Angelo Berchieri Júnior e Rosemeire de Oliveira pelo convívio no Departamento de Patologia Veterinária.

À banca examinadora pelas valiosas críticas e contribuições.

Aos funcionários da FCAV-Unesp/Jaboticabal pela ajuda principalmente do Departamento de Patologia Veterinária, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca.

A Universidade Estadual Paulista pela formação formal e informal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de estudos concedida, processo FAPESP 2013/13186-5.

Aos meus professores que contribuíram para a minha formação. Obrigada pelo exemplo e dedicação.

Sumário

CHAPTER 1 - General considerations.....	1
References	4
CHAPTER 2 - Anaplasmatataceae agents among wild mammals and ectoparasites in a Brazilian wetland. Ticks and Tick-Borne Diseases	13
Introduction.....	14
Material and Methods	14
Results.....	23
Discussion.....	39
References	44
CHAPTER 3 - Molecular detection of <i>Bartonella</i> spp. in wild mammals and ectoparasites, with insights of a possible vector among rodents in Brazilian Pantanal. Microbes & Infection.....	56
Introduction.....	56
Material and Methods	57
Results.....	64
Discussion.....	70
References	73
CHAPTER 4 - Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. Acta.....	79
Introduction.....	79
Material and Methods	80
Results.....	86
Discussion.....	96
References	101
CHAPTER 5 - <i>Rickettsia</i> spp. among wild mammals and their respective ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. Ticks and Tick-Borne Diseases	111
Introduction.....	112

Material and Methods	113
Results	121
Discussion	129
References	133

CHAPTER 6 - Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the route. Veterinary Parasitology

.....	145
Introduction	146
Material and Methods	148
Results	154
Discussion	160
References	164

CHAPTER 7 - Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in southern Pantanal, Brazil. Parasitology Journal

.....	177
Introduction	177
Material and Methods	179
Results	185
Discussion	196
References	201

CHAPTER 8 - Final considerations 214

DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA REGIÃO DO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE

RESUMO - As enfermidades transmitidas por artrópodes vêm sendo recentemente estudadas em animais selvagens brasileiros, os quais podem atuar como hospedeiros tanto para os vetores quanto para os patógenos, muitos dos quais apresentam potencial zoonótico. O presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência de agentes transmitidos por artrópodes (agentes Anaplasmataceae, *Bartonella* spp., mycoplasmas hemotróficos, *Rickettsia* spp., *Hepatozoon* spp. e piroplasmídeos) em animais selvagens, cães domésticos e seus respectivos ectoparasitos, amostrados na região do Pantanal sul matogrossense, por meio de métodos sorológicos e moleculares. Para tal, 31 *Nasua nasua*, 78 *Cerdocyon thous*, sete *L. pardalis*, 42 cães, 110 roedores e 30 marsupiais foram capturados. Os carrapatos recolhidos (1582) dos animais pertenciam às espécies *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum*, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato e *Amblyomma auricularium*. Adicionalmente, 80 pulgas *Polygenis (Polygenis) bohlsi bohlsi* foram recolhidas. Quatorze (17,9%) *C. thous*, sete (16,6%) cães e um (3,2%) *N. nasua* mostraram-se soropositivos (títulos \geq 80) para *Ehrlichia canis*, com títulos de anticorpos variando de 80 a 1280. Nenhum animal mostrou-se soropositivo *Anaplasma phagocytophilum*. Nove cães, dois *C. thous*, um *N. nasua*, oito roedores, cinco marsupiais e um pool de pulgas *P. (P.) b. bohlsi* mostraram-se positivos para *Ehrlichia* spp. Todos os cães e o pool de pulgas *P. (P.) b. bohlsi* positivos para *Ehrlichia* spp. foram também positivos em para o ensaio em tempo real quantitativo (qPCR) para *E. canis*, baseado no gene *dsb*. Sete *N. nasua*, dois *C. thous*, um *L. pardalis*, quatro roedores, três marsupiais, 15 carrapatos *A. sculptum*, dois *A. ovale*, dois *A. parvum* e um pool de larvas de *Amblyomma* spp. foram positivos para *Anaplasma* spp. Co-positividade ou co-soropositividade para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. foi observada em dois cães, um *N. nasua*, um *C. thous* e dois marsupiais. Trinta e cinco roedores selvagens e três pools de pulgas *P. (P.) b. bohlsi*, mostraram-se positivos nos ensaios moleculares para *Bartonella* spp. A análise filogenética revelou que pelo menos dois genótipos diferentes estão circulando entre os roedores amostrados no bioma Pantanal. Os resultados parciais sugerem que a pulga *P. (P.) b. bohlsi* possa estar atuando como um possível vetor de *Bartonella* nesta região. Vinte e quatro *N. nasua*, três *C. thous*, dois cães e um roedor mostraram-se positivos para *Mycoplasma* spp. A análise filogenética apontou que os cães, *C. thous* e *N. nasua* aparentam estar sendo parasitados pela mesma espécie de *Mycoplasma* spp., filogeneticamente relacionada a *M. haemocanis*/*M. haemofelis* e que provavelmente um novo genótipo de *Mycoplasma* spp. está circulando entre os *N. nasua* e *C. thous* amostrados no bioma Pantanal. Vinte e sete (64,2%) cães, 59 (7,6%) *C. thous* e seis (85,7%) *L. pardalis* mostraram-se soropositivas para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*. Para 17 (40,4%) cães, 33 (42,3%) *C. thous* e dois (33,3%) *L. pardalis*, foram observadas reações homólogas para *Rickettsia amblyommatis*. Cento e dezesseis carrapatos (93 *A. parvum*, 14 *A. sculptum*, três *A. auricularim* e seis pools de larvas de *Amblyomma*) e uma amostra

de sangue obtida de *C. thous*, mostraram-se positivas nos ensaios para as espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa. As amostras seqüenciadas obtidas dos carrapatos *A. parvum*, mostraram-se filogeneticamente relacionadas com 'Candidatus *Rickettsia andeanae*'. Uma alta ocorrência de *Hepatozoon* foi encontrada nos carnívoros amostrados (*C. thous* [91,02%], cães [45,23%], *N. nasua* [41,9%] e *L. pardalis* [71,4%]), porém nenhum artrópode mostrou-se positivo. Adicionalmente, 24 roedores e um marsupial também mostraram-se positivos para *Hepatozoon* spp. Com base na análise filogenética, os *C. thous*, *L. pardalis*, *N. nasua*, cães, roedores e marsupiais aparentam não estar sendo parasitados pela mesma espécie de *Hepatozoon* spp. Sete cães, um *C. thous*, cinco *L. pardalis*, três *N. nasua*, seis roedores, oito carrapatos *A. parvum*, dois *A. sculptum* e um *A. ovale* mostraram-se positivos para os ensaios PCR de piroplasmídeos. Genótipos filogeneticamente relacionados com *Babesia canis vogeli* foram detectados em seis cães e cinco roedores. Genótipos filogeneticamente relacionados com *Babesia caballi* foram detectados em um *C. thous*, um cão, um carrapato *A. ovale* e um *A. sculptum* e genótipos relacionados com *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* foram detectados em quatro carrapatos *A. parvum*. Quatro seqüências obtidas de *A. parvum*, três *N. nasua* e um roedor mostraram-se filogeneticamente relacionadas com *Theileria equi*. Por fim, *Cytauxzoon* spp. foi detectado em quatro *L. pardalis*. O presente trabalho mostra, portanto, a ocorrência de agentes transmitidos por artrópodes vetores em animais selvagens e domésticos no Pantanal sul matogrossense.

Palavras-chave: Agentes Anaplasmataceae., *Bartonella* spp., micoplasmas hemotróficos, Rickettsiales, *Hepatozoon* sp. e piroplasmídeos

SEROLOGICAL DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AGENTS TRANSMITTED BY ARTHROPOD VECTORS IN WILD AND DOMESTIC ANIMALS IN THE REGION OF THE SOUTHERN MATO GROSSO PANTANAL

ABSTRACT - The diseases transmitted by arthropods have been recently studied in Brazilian wildlife, which can act as hosts for vectors and pathogens, many of which have zoonotic potential. The present work aimed to investigate the occurrence of tick-borne agents (Anaplasmataceae agents, *Bartonella* spp., hemotropic mycoplasmas, *Rickettsia* spp., *Hepatozoon* spp. and piroplasms) in wild animals, domestic dogs and their respective ectoparasites, in southern Pantanal region, central-western Brazil, by serological and molecular assays. For this reason, 31 *Nasua nasua*, 78 *Cerdocyon thous*, seven *L. pardalis*, 42 dogs, 110 rodents and 30 marsupials were captured. The ticks collected (1582) from animals belonged to the species *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum*, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Amblyomma auricularium*. Additionally, 80 *Polygenis (Polygenis) bohlsi bohlsi* fleas were collected. Overall, 14 (17.9%) *C. thous*, seven (16.6%) dogs and one (3.2%) *N. nasua* were seroreactive (titer \geq 80) to *Ehrlichia canis*, with titers ranging from 80 to 1280. No animal showed to be seroreactive for *A. phagocytophilum* antigen. Nine dogs, two *C. thous*, one *N. nasua*, eight rodents, five marsupials and one *P. (P.) b. bohlsi* pool were positive for *Ehrlichia* spp. All positive dogs and the only *P. (P.) b. bohlsi* pool positive for *Ehrlichia* spp. were also positive in specific *E. canis*-qPCR based on *dsb* gene. Seven *N. nasua*, two dogs, one *C. thous*, one *L. pardalis*, four rodents, three marsupials, 15 *A. sculptum*, two *A. ovale*, two *A. parvum* and one *Amblyomma* larvae pool were positive for *Anaplasma* spp. Co-positivity or co-seropositivity for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. was observed in two dogs, one *N. nasua*, one *C. thous* and two marsupials. Thirty-five rodents and three *P. (P.) b. bohlsi* flea pools, showed to be positive to *Bartonella* spp. in the molecular assays. The phylogenetic analysis revealed that at least two different genotypes are circulating among the rodents sampled in the Pantanal biome. Partial results suggest that the flea *P. (P.) b. bohlsi* may be acting as a possible *Bartonella* vector in this region. Twenty-four *N. nasua*, three *C. thous*, two dogs and one rodent, were positive for *Mycoplasma* spp. Phylogenetic analysis indicated that dogs, *C. thous* and *N. nasua* appear to share the same *Mycoplasma* spp. species, closely related to *M. haemocanis* / *M. haemofelis* and probably a new genotype of *Mycoplasma* spp. is circulating among the *N. nasua* and *C. thous* sampled in the Pantanal biome. Overall, 27 (64.2%) dogs, 59 (75.6%) *C. thous* and six (85.7%) *L. pardalis* were seroreactive to at least one *Rickettsia* species. For 17 (40.4%) dogs, 33 (42.3%) *C. thous*, and two (33.3%) *L. pardalis*, homologous reactions to *Rickettsia amblyommatis* were suggested. One hundred and sixteen ticks (93 *A. parvum*, 14 *A. sculptum*, three *A. auricularim* and six *Amblyomma* larvae pools) and one blood sample obtained from *C. thous* showed positive results for *Rickettsia* spotted fever group species. The sequenced samples obtained from *A. parvum* ticks showed to be closely related to 'Candidate *Rickettsia andeanae*'. A high occurrence of *Hepatozoon* was found in carnivores (*C. thous* [91.02%], dogs [45.23%], *N. nasua* [41.9%] and *L. pardalis* [71.4%]), however no arthropod showed positive results. Additionally, twenty-four rodents and a marsupial also showed positivity to *Hepatozoon* spp. Based on phylogenetic analysis, *C. thous*, *L. pardalis*, *N. nasua*,

dogs, rodents and marsupials appear not to share the same of *Hepatozoon* species. Seven dogs, one *C. thous*, five *L. pardalis*, three *N. nasua*, six rodents, eight *A. parvum*, two *A. sculptum* and one *A. ovale* were positive for piroplasmids-PCR assays. Genotypes closely related to *Babesia vogeli* were detected in six dogs and five rodents. While genotypes closely related to *Babesia caballi* were detected in one *C. thous*, one dog, one *A. ovale* and one *A. sculptum*, genotypes closely related to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* were detected in four *A. parvum* ticks. Four sequences obtained from *A. parvum*, three *N. nasua* and one wild rodent were closely related to *Theileria equi*. Lastly, *Cytauxzoon* spp. was detected in four *L. pardalis*. The present work shows the occurrence of vector-borne agents in wild and domestic animals in southern mato grosso Pantanal.

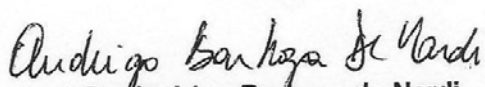
Keywords: Anaplasmataceae agents, *Bartonella* spp., micoplasmas hemotróficos, Rickettsiales, *Hepatozoon* sp. and piroplasms.

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 006772/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes em animais selvagens e domésticos na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense**", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Mirela Tinucci Costa, pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de Abril de 2013.

Jaboticabal, 11 de Abril de 2013.


Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi
Coordenador - CEUA



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38787-1	Data da Emissão: 17/05/2013 18:37	Data para Revalidação*: 16/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA REGIÃO DO PANTANAL, SULMATOGRSSENSE Título do Projeto: DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão de literatura	04/2013	06/2016
2	Colheita das amostras	06/2013	03/2016
3	PCR para os agentes sob estudo	08/2013	08/2016
4	Clonagem e seqüenciamento dos amplicons positivos	08/2013	10/2016
5	Sorologia	01/2014	06/2016
6	Análise das seqüências - Filogenia molecular	01/2014	11/2016
7	Discussão dos resultados e redação final	01/2017	03/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Todos os procedimentos deverão ser supervisionado por médico veterinário
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Heitor Miraglia Herrera	Pesquisador Colaborador	444.869.871-87	049724503 IFP-RJ	Brasileira
2	Rosângela Zacarias Machado	Pesquisadora Colaboradora	125.043.436-04	M4034143 SSP-MG	Brasileira

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

Código de autenticação: 16794825





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38787-1	Data da Emissão: 17/05/2013 18:37	Data para Revalidação*: 16/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA REGIÃO DO PANTANAL SULMATOGROSSENSE Título do Projeto: DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

3	GUILHERME DE MIRANDA MOURÃO	Pesquisador Colaborador- Captura dos animais	488.045.506-78	418653 SSP-MS	Brasileira
4	Keyla Carstens Marques de Sousa	Doutoranda- colheita e processamento das amostras	017.801.431-17	001261455 ssp-MS	Brasileira
5	Fabiana Lopes Rocha	Pesquisadora Colaboradora	696.485.571-87	1751282 SSP-DF	Brasileira
6	Mirela Tinucci Costa	Pesquisadora Colaboradora	022.973.488-00	7758598 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Clyomys laticeps, Monodelphis domestica, Thylamys macrurus, Leopardus pardalis, Gracilinanus agilis, Nasua nasua, Oecomys mamorae, Cerdocyon thous
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Nasua nasua, Gracilinanus agilis, Thylamys macrurus, Clyomys laticeps, Oecomys mamorae, Leopardus pardalis, Monodelphis domestica, Cerdocyon thous

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue, Ectoparasita
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Ectoparasita, Sangue
3	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
4	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	

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

Código de autenticação: 16794825





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38787-1	Data da Emissão: 17/05/2013 18:37	Data para Revalidação*: 16/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA REGIÃO DO PANTANAL SULMATOGROSSENSE Título do Projeto: DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 16794825





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38787-1	Data da Emissão: 17/05/2013 18:37	Data para Revalidação*: 16/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
ANIMAIS SELVAGENS E DOMESTICOS NA REGIAO DO PANTANAL SULMATOGROSSENSE Título do Projeto: DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 16794825



CHAPTER 1 - General considerations

The arthropod-borne diseases have great importance to human and animal health, involving several infectious agents, hosts and vectors (HARRUS AND BANETH, 2006). The geographic distribution of arthropods and vector-borne agents is expanding, due to climatic, ecological and environmental changes. The presence of domestic animals in wild environments and, vice versa, resulted in a closer association between wild reservoirs, arthropod vectors, domestic animals and humans (SHAW et al., 2001; ANDRÉ et al., 2012).

Several studies have been investigated the role of wildlife in the epidemiology of diseases caused by Anaplasmataceae agents. The recent molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* (SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015) in domestic dogs in Brazil, associated to the detection of new genotypes of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in deer (MACHADO et al., 2006; SACCHI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012), carnivorous birds (MACHADO et al., 2012), wild canids (ANDRÉ et al., 2012), domestic cats and neotropical wild felines species (ANDRÉ et al., 2010b; 2012; 2014; 2015) and antibodies anti-*E. chaffeensis* in apparently healthy humans or with clinical signs compatible with tick-borne diseases (COSTA et al., 2005), demonstrate the need for further studies on the molecular characterization of the agents above mentioned. It is also worth mentioning the molecular detection of a closely related to *Ehrlichia ruminantium* agent in (*Panthera onca*) in southern Pantanal (WIDMER et al., 2011) and a new *Ehrlichia* genotype in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (CABEZAS-CRUZ et al., 2012), which is able to cause clinical symptoms in bovines (AGUIAR et al., 2014), highlighting the importance of future studies, due to the livestock take part of several economy segments in Brazil (IBGE 2008).

Bartonella species and hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas) are important pathogens that circulate between mammals and invertebrate hosts. Studies regarding the prevalence and pathogenicity of *Bartonella* and hemoplasmas among wild mammals are scarce, especially in Brazil. Until now, *Bartonella* have been detected only in captive felids (GUIMARÃES et al., 2010) and wild and synanthropic rodents (COSTA et al., 2014; FAVACHO et al., 2015; GONÇALVES et

al., 2016). In addition to this, serological evidence of exposure to *Bartonella* spp. has been reported in wild canids maintained in captivity in zoos of São Paulo state (FLEISCHMAN et al., 2015). In relation to the occurrence of hemotrophic mycoplasmas in Brazil, recent studies have detected hemoplasm DNA in wild rodents and non-human neotropical primates (BONATO et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015), suggesting the possibility of these animals acting as possible reservoirs for these agents. Besides, hemoplasmas have also been detected in wild carnivores maintained in captivity in zoos (WILLI et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2007; ANDRÉ et al., 2011a) and deer (GRAZZIOTIN et al., 2011) in Brazil. Considering the fact that some *Bartonella* and hemotrophic mycoplasmas species are considered emergent zoonotic agents (BREITSCHWERD et al., 2010; MAGGI et al., 2013), studies aiming at assessing the epidemiology of these agents and their respective vectors are much needed.

Rickettsia species genetically classified into the spotted fever group (SFG) are tick-borne agents showing great zoonotic importance in the world (PAROLA et al., 2005). In Brazil, the most important SFG agent is *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Brazilian spotted fever, which is the most deadly rickettsiosis globally (LABRUNA, 2009). Besides, the Atlantic rainforest strain of *Rickettsia parkeri*-like agent has also shown to cause spotted fever in humans (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Rickettsial agents have been previously detected in ticks (Acari: Ixodidae) and domestic animals (dogs and horses) in Pantanal biome (WIDMER et al., 2011; ALVES et al., 2014; NIERI-BASTOS et al., 2014; MELO et al., 2011, 2015, 2016; WITTER et al., 2016). Among wild animals sampled in Pantanal, only a serological evidence of exposure to *Rickettsia* spp. has been reported in wild jaguars (*Panthera onca*) in southern Pantanal (WIDMER et al., 2011).

Several studies have been conducted in order to investigate the role of wildlife in the epidemiology of arthropod-borne diseases. For instance, wild animals are considered reservoirs for *Hepatozoon* spp., due to the fact that the infections present usually a subclinical course (METZGER et al., 2008; ANDRÉ et al., 2010a). However, some studies revealed that infections with *Hepatozoon* spp. in young wild canids has been occasionally associated with clinical disease in coyotes (KOCAN et al., 2000; GARRET et al., 2005) and mortality in hyenas (EAST et al., 2008). *Hepatozoon* spp.

may be considered a potential opportunistic pathogens in immunocompromised animals or with concomitant infections (DAVIS et al., 1978; BANETH et al., 1998; KUBO et al., 2006). Therefore, further studies are recommended in order to estimate the impact of these parasites among the Brazilian wildlife.

Piroplasmoses are one of the most prevalent arthropodborne diseases of animals. Piroplasmoses are caused by hemoprotozoan parasites of the phylum Apicomplexa belonging to four related genera: *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* and *Rangelia* (YABSLEY and SHOCK, 2012). These parasites have a great economic and veterinary impact worldwide and are considered to be the second most commonly found parasites in the blood of mammals after trypanosomes (SCHNITTGER et al., 2012). There are few reports concerning the seroprevalence and molecular detection of piroplasmids in wild carnivores. In Brazil, André et al. (2011b) found a seroprevalence of 31.74% and 10.31% against *B. vogeli* antigen in wild felines and canids maintained in captivity, respectively. Among wild felines, André et al. (2011b) detected a closely related genotype to *Babesia leo* in neotropical wild cat (*Oncifelis colocolo*) and cape genet (*Genetta tigrina*) also maintained in captivity in zoos in the state of São Paulo, Brazil. In relation to *Cytauxzoon* spp., fatal cases of cytauxzoonosis were reported in two lions maintained in captivity in a zoo in Rio de Janeiro state (PEIXOTO et al., 2007). Besides, André et al. (2009) detected *Cytauxzoon* DNA closely related to *C. felis* in asymptomatic neotropical felines also maintained in captivity in zoos in the state of São Paulo. Furthermore, *Cytauxzoon* spp. was detected in domestic cats from Rio de Janeiro (MAIA et al., 2013) and Mato Grosso do Sul (ANDRÉ et al., 2015) states.

Due to the lack of information about the epidemiology of arthropod-borne agents among wildlife in southern Pantanal, the present study aimed to investigate the occurrence of *Hepatozoon* spp., *Bartonella* spp., hemotrophic mycoplasmas, Anaplasmataceae and Rickettsiales agents, and piroplasmas in wild mammals and domestic dogs and their respective ectoparasites, in the region of Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, central-western Brazil, using molecular and serological assays,

References

- AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L.; BRAGA, I. A.; WITTER R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S.; LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks Tick Borne Diseases**, v.5, n.5, p.537-544, 2014.
- ALVES, A. S.; MELO, A. L. T.; AMORIM, M. V.; BORGES, A. M. C. M.; GAÍVA E SILVA, L.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in equids and molecular detection of „*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma cajennense* sensu lato ticks from the Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 1242–1247, 2014.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H.; DAGNONE, A. S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Amsterdam, v. 45, p. 234-237, 2009.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 134 - 138, 2010a.
- ANDRÉ, M. R., ADANIA, C. H., MACHADO, R. Z., ALLEGRETI, S. M., FELIPPE, P. A. N., SILVA, K. F., NAKAGHI, A. C. H. Molecular detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Amsterdam, v.46, p.1017 - 1023, 2010b

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; ALLEGRETI, S. M.; MACHADO, R. Z. Hemoplasmas in wild canids and felids from Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 2, p. 342-347, 2011a.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; ALLEGRETI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in Brazilian zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v.42, p.139 -143, 2011b.

ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; SCORPIO, D. G.; TEIXEIRA, R. H. F.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 247-253, 2012.

ANDRÉ, M. R.; DENARDI, N. C. B.; SOUSA, K.C.M.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P. C.; ONTIVERO, C. R. G. R.; GONZALEZ, I, H. L.; NERY, C. V. C.; CHAGAS, C. R. F.; MONTICELLI, C.; SANTIS, A. C. G. A.; MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.545–551, 2014.

ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M.; DE JESUS FERNANDES, S.; DE SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; DOMINGOS, I. H.; DE MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.6 n.6 p.779-786, 2015.

BANETH, G.; AROCH, I.; TAL, N.; HARRUS, S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 123-133, 1998.

BONATO, L.; FIGUEIREDO, M. A.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and

hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**, v. 42, p. 15-20, 2015.

BREITSCHWERDT, E. B., MAGGI, R. G., CHOMEL, B. B., LAPPIN, M. R. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 8–30, 2010.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; RIBEIRO, M. F.; DA SILVEIRA, J. A.; DE LA FUENTE, J.; GRUB-HOFFER, L.; VALDÉS, J. J.; PASSOS, L. M. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. **Parasites and Vectors**, v.5, p.291, 2012.

COSTA, F.; PORTER, F. H.; RODRIGUES, G.; FARIAS, H.; DE FARIA, M. T.; WUNDER, E. A.; OSIKOWICZ, L. M.; KOSOY, M. Y.; REIS, M. G.; KO, A. I.; CHILDS, J. E. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2014.

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

DAVIS, D. S.; ROBINSON, R. M.; CRAIG, T. M. Naturally occurring hepatozoonosis in a coyote. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 244-246, 1978.

EAST, M. L.; WIBBELT, G.; LIECKFELDT, D.; LUDWIG, A.; GOLLER, K.; WILHELM, K., SCHARES, G., THIERER, D., HOFER, H. A *Hepatozoon* species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengeti ecosystem, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, .p. 45–52, 2008.

FAVACHO, A. R.; ANDRADE, M. N.; DE OLIVEIRA, R. C.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P.S.; DE LEMOS, E. R. Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 11-12, p. 889-992, 2015.

FLEISCHMAN, D. A.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z. *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* exposure in captive wild canids in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 3, p. 573-577, 2015.

GARRET, J. J.; KOCAN, A. A.; REICHARD, M. V.; PANCIERA, R. J.; BAHR, R. J. Experimental infection of adult and juvenile coyotes with domestic dog and wild coyote isolates of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, p. 588–592, 2005.

GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L.; MATOS, C. A.; FERNANDES, S. DE J.; OLMOS, I. D.; MACHADO, R. Z.; .ANDRÉ, M.R. Diversity and molecular characterization of novel hemoplasmas infecting wild rodents from different Brazilian biomes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**, v. 43, p. 50-56, 2015.

GONÇALVES, L. R.; FAVACHO, A. R.; ROQUE, A. L.; MENDES, N. S.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; BENEVENUTE, J. L.; HERRERA, H. M.; D'ANDREA, P. S.; DE LEMOS, E. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Association of *Bartonella* Species with Wild and Synanthropic Rodents in Different Brazilian Biomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 7154-7164, 2016.

GRAZZIOTIN, A. L.; DUARTE, J. M.; SZABÓ, M. P.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M.; MOHAMED, A.; VIEIRA, R. F.; DE BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, p. 1005–1011, 2011.

GUIMARÃES, A. M. S.; JAVAROUSKY, M. L.; BONAT, M.; LACERDA, O.; BALBINOTTI, B.; QUEIROZ, L. G. P. B.; TIMENETSKY, J.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Molecular detection of „*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in a lion (*Panthera lion*) from a Brazilian zoological garden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 195-196, 2007.

GUIMARÃES, A. M. S.; BRÃNDÃO, P. E.; MORAES, W.; KIIHL, S.; SANTOS, L. C.; FILONI, C.; CUBAS, Z. S.; ROBES, R. R.; MARQUES, L. M.; NETO, R. L.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; CATÃO-DIAS, J. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. Detection of *Bartonella* spp in neotropical felids and evaluation of risk factors and hematological abnormalities associated with infection. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 346-351, 2010.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoan and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1309-1318, 2006.

IBGE. Indicadores IBGE: **Estatística da Produção Pecuária**. Brasília, Brazil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 29, 2008.

KOCAN, A. A.; CUMMINGS, C. A.; PANCIERA, R. J.; MATHEW, J. S.; EWINGII, S. A.; BARKER, R. W. Naturally occurring and experimentally transmitted *Hepatozoon americanum* in coyotes from Oklahoma. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p.149-153, 2000.

KUBO, M.; MIYOSHI, N.; YASUDA, N. Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cats. **The Journal of veterinary medical science**, v.68, p.833–837, 2006.

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

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

MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUZA, E.; ALVES JUNIOR, J.R.F.; GAVIOLI, F.A.; Migratory and carnivore birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 12, p. 705-708, 2012.

MAGGI, R. G.; COMPTON, S. M.; TRULL, C. L.; MASCARELLI, P. E.; MOZAYENI, B. R. BREITSCHWERDT, E. B. Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. **Journal of clinical Microbiology**, v. 51, n.10, p. 3237–3241, 2013.

MAIA, L. M.; CERQUEIRA, A. DE. M.; DE BARROS, MACIEIRA, D.; DE SOUZA, A. M.; MOREIRA, N. S.; DA SILVA, A. V.; MESSICK, J. B.; FERREIRA, R. F.; ALMOSNY, N. R. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n.2, p.289-291, 2013.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.2, p. 213–218, 2011.

MELO, A. L. T.; ALVES, A. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARTINS, T. F.; WITTER, R.; PACHECO, T. A.; SOARES, H. S.; MARCILI, A.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. *Rickettsia parkeri* infesting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, p. 237–241, 2015.

MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p.112-116, 2016.

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.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. „*Candidatus* Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, p. 259–261, 2014.

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

PEIXOTO, P.V.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T.N.; BARROS, S.S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.145, n.3-4, p.383-387, 2007.

SACCHI, A. B. V.; DUARTE, J. M. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 325-334, 2012.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. *Babesia*: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-1809, 2012.

SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; VILELA, J. A. R.; SANTOS, T. M.; FACCINI, J. L. H.; BALDANI, C. D. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, p. 770-774, 2011.

SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 193-209, 2001.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p. 275–278, 2011.

SILVEIRA, J. A.; RABELO, E. M.; RIBEIRO, M. F. Molecular detection of tickborne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, p. 353–360, 2012.

SILVEIRA, J. A.; VALENTE, P. C.; PAES, P. R.; VASCONCELOS, A. V.; SILVESTRE, B. T.; RIBEIRO, M. F. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.6, n.3, p.242-245, 2015.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 521–523, 2010.

YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology**, v. 2, p. 18-31, 2012.

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

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORGIS, M. P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1159–1166, 2007.

WITTER, R.; MARTINS, T. F.; CAMPOS, A. K.; MELO, A. L.; CORRÊA, S. H.; MORGADO, T. O.; WOLF, R. W.; MAY-JÚNIOR, J. A.; SINKOC, A. L.; STRÜSSMANN, C.; AGUIAR, D. M.; ROSSI, R. V.; SEMEDO, T. B.; CAMPOS, Z.; DESBIEZ, A. L.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, p. 415-423, 2016.

CHAPTER 8 - Final considerations

Conclusions

- Wild animals from southern Pantanal region, central-western Brazil, are exposed to *Hepatozoon* spp., *Bartonella* spp., hemotropic mycoplasmas, Anaplasmataceae, piroplasmids and *Rickettsia* spp. agents;
- Wild carnivores, rodents and domestic dogs sampled in southern Pantanal seemed not to share the same *Hepatozoon* species;
- Rodents in Pantanal region may play a role in the routes of transmission for *Hepatozoon* species to reptiles and amphibians;
- Wild rodents in southern Pantanal region, Brazil, are exposed, at least, to two different *Bartonella* species;
- *Polygenis (P.) bohlsi bohlsi* fleas may act as a possible vectors for *Bartonella* spp. among rodents in southern Pantanal, Brazil;
- Domestic dogs, crab-eating foxes and coatis seemed to share the same *Mycoplasma* spp. species, closely related to *M. haemocanis*/*M. haemofelis*;
- Wild felines and rodents appear to be infected by specific hemoplasmas species;
- The real role of arthropods in hemoplasmas and *Hepatozoon* transmission cycles in southern Pantanal remains unknown;
- A new *Mycoplasma* genotype was detected among wild coatis and crab-eating foxes in southern Pantanal;
- Domestic dogs, crab-eating foxes and ocelots seemed to be exposed to *R. amblyommatis* sp. nov. or a closely related species;
- A high occurrence of „*Candidatus. Rickettsia andeanae*“ was found among *Amblyomma parvum* ticks collected from sampled wild animals in southern Pantanal region.