

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

**INVESTIGAÇÃO DE *BABESIA*, *HEPATOZON* E
EHRLICHIA EM GAMBÁS (*Didelphis* sp.) DE VIDA
LIVRE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

STEPHANY ROCHA RIBEIRO

Botucatu – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

**INVESTIGAÇÃO DE *BABESIA*, *HEPATOZON* E
EHRLICHIA EM GAMBÁS (*Didelphis* sp.) DE VIDA
LIVRE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

STEPHANY ROCHA RIBEIRO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens, área de Clínica-Cirúrgica, Saúde e Meio Ambiente, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Hidalgo

Friciello Teixeira

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Assoc. Lúcia

Souza Lima Silveira da Mota

Botucatu – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ribeiro, Stephany Rocha.

Investigação de *Babesia*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia* em gambás (*Didelphis sp.*) de vida livre do Estado de São Paulo, Brasil
/ Stephany Rocha Ribeiro. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

Orientador: Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira
Coorientador: Lígia Souza Lima Silveira da Mota
Capes: 50502042

Palavras-chave: Bactérias; Biologia molecular; Gambás; Hemoparasitos; Protozoários.

Nome da autora: **Stephany Rocha Ribeiro**

TÍTULO: Investigação de *Babesia*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia* em gambás (*Didephis* sp.) de vida livre do Estado de São Paulo, Brasil

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira

Presidente e Orientador

Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Jairo Alfonso Mendoza Roldan

Titular

Universidade de Bari

Dr. Gilberto Salles Gazeta

Titular

Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Suplente

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dra. Ana Beatriz Pais Borsoi

Suplente

Fundação Oswaldo Cruz

Data da defesa: 13 de setembro de 2024

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Simone, minha avó, Jaci,
e às minhas sobrinhas, Leticia e Luana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, pelas bênçãos derramadas sobre mim, pelos desafios que me fizeram crescer e evoluir, pelas pessoas colocadas em minha vida e por todas as oportunidades.

Agradeço imensamente à minha família. À minha mãe por sempre me aplaudir tão alto que qualquer outra ausência foi atenuada. Minha sobrinha Letícia, meus avós Jaci e Justino, meu irmão Felipe e meu padrasto Diogo. Letícia, sou extremamente grata a Deus por ser sua tia e ter a honra de viver a vida ao seu lado, você me inspira a cuidar da minha criança interior. Vocês são a minha base, amo vocês.

Meu namorado que há 10 anos caminha ao meu lado, Marlon, você traz leveza e calma fazendo com que minha jornada seja mais leve. Obrigado por todo o apoio sempre, te amo.

Ao meu orientador professor Dr^o Rodrigo H.F. Teixeira por me guiar desde o início do projeto, ceder as amostras provenientes do Zoológico de Sorocaba e abrir portas que possibilitaram a realização da minha pesquisa.

À minha coorientadora Dr^a Ligia S. L. S. Mota por me receber de portas abertas em seu laboratório, por todo o ensinamento passado e todo o apoio.

Aos meus amigos de Botucatu por me acolherem, me receberem em suas casas, me auxiliarem nos meus experimentos e me ajudarem a passar por esse momento tão desafiador: Larissa Rodrigues, Isabel Ferreira, Mariana Santos, Luiz Barbosa, João Mochiuti, Catharina Resende, Laura Morelli, Lívia, Matheus Machado.

Ao Programa de Pós Graduação em Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" por ceder as amostras dos animais incluídos neste estudo, às residentes por realizarem as coletas sanguíneas dos animais e à médica veterinária Paula Sader por realizar os exames laboratoriais.

Ao Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres por ceder as amostras dos animais incluídos neste estudo e toda a equipe por realizarem as coletas sanguíneas e os exames laboratoriais de cada indivíduo. Agradecimento especial à Ticiane Zwarg por todo o suporte na comissão científica do CeMaCAS.

À Larissa Rodrigues por ceder as amostras dos animais oriundos de Botucatu incluídos neste estudo.

Ao João Mochiuti pelo auxílio na leitura das lâminas de esfregaços sanguíneos.

À equipe do Laboratório de Carrapatos e outros Artrópodes Ápteros, do Instituto Oswaldo Cruz por me receberem tão bem e por me auxiliarem nas PCRs, purificação e sequenciamento das minhas amostras. Ao professor Drº Gilberto Salles Gazeta por permitir que eu realizasse parte da minha pesquisa na FIOCRUZ, à Drª Ana Beatriz Borsoi, Mariana Guimarães e à Ingrid Machado por toda a ajuda na execução das atividades moleculares e à toda equipe do laboratório pelo acolhimento, vocês fizeram eu me sentir em casa.

Ao João Pedro Siqueira Palmer por generosamente ceder os controles positivos de *Babesia* e *Hepatozoon*.

À Drª Karla Bitencourth pela análise dos dados do sequenciamento genético e pela construção da filogenia.

Ao Rodrigo Bonifácio e à Gabriela Ingegneri pelo auxílio na análise dos dados estatísticos dos hemogramas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo auxílio financeiro – Código de Financiamento 001.

À Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP Botucatu (CEUA–FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu), ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), pelas licenças que viabilizaram a execução do trabalho de campo da minha dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Babesia</i> spp.....	20
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Hepatozoon canis</i>	26
Figura 3. Ciclo biológico da <i>Ehrlichia</i> spp.....	31
Figura 4. Papel ecológico dos gambás.....	40
Figura 5. Localização geográfica dos locais de coleta das amostras biológicas dos gambás inseridos no presente estudo.	42
Figura 6. Localização geográfica do PZMQB, no município de Sorocaba.	43
Figura 7. Localização geográfica do CeMaCAS, no município de São Paulo..	44
Figura 8. Localização geográfica do VAS, no município de Botucatu.	45
Figura 9. Coleta sanguínea em <i>Didelphis albiventris</i>	46
Figura 10. Fluxograma das análises laboratoriais realizadas no estudo.	48
Figura 11. Fluxograma das análises moleculares realizadas no estudo.	53
Figura 12. Inclusões em leucócitos (setas) sugestivas de <i>Ehrlichia</i> spp.....	56
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose da PCR para <i>Babesia</i> spp.....	59
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose da PCR para <i>Babesia</i> spp.....	59
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose da PCR para <i>Ehrlichia</i> spp.....	60
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose da PCR para <i>Ehrlichia</i> spp.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico

BLASTn – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico para nucleotídeos

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CeMaCAS – Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRAS – Centro de Reabilitação de Animais Silvestres

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGC – Erliquiose granulocítica canina

EGH – Erliquiose granulocítica humana

EMC – Erliquiose monocítica canina

EMH – Erliquiose monocítica humana

IBB – Instituto de Biociências de Botucatu

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

fL – Fentolitro

g/dL – Gramas por decilitro

MMA – Ministério do Meio Ambiente

mm³ – Milímetro cúbico

ng – Nanograma

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

pg – Picograma

PZMQB - Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros"

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SP – São Paulo

V – Voltagem

VAS – Vigilância Ambiental em Saúde

μL – Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos patógenos em gambás, biomas brasileiros e técnicas de diagnóstico utilizadas.	36
Tabela 2. Relação das espécies descritas do gênero <i>Didelphis</i> , distribuição geográfica e status de conservação segundo a IUCN.....	38
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp. e/ou <i>Ehrlichia</i> spp.	51
Tabela 4. Informações relativas às espécies dos gambás inseridos no estudo.	54
Tabela 5. Informações relativas ao sexo e à faixa etária dos gambás inseridos no estudo.	54
Tabela 6. Valores mínimos, máximos, média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de <i>Didelphis albiventris</i> do Estado de São Paulo.	55
Tabela 7. Valores mínimos, máximos, média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de <i>Didelphis aurita</i> do Estado de São Paulo.	55
Tabela 8. Esfregaço sanguíneo das amostras dos gambás examinados.....	57
Tabela 9. Dados das amostras positivas do presente estudo.	61
Tabela 10. Resultados do BLASTn para o gene <i>Babesia</i>	61
Tabela 11. Resultados do BLASTn para o gene <i>Ehrlichia</i>	62

RESUMO

Ribeiro, Stephany Rocha. Investigação de *Babesia*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia* em gambás (*Didelphis* sp.) de vida livre do Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Animais Selvagens) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, p.101, 2024.

Como resultado da crescente urbanização há um impacto negativo na fauna e na flora, resultando em desequilíbrios ecológicos que podem desencadear na transmissão de zoonoses. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de hemoparasitas em sangue de gambás de vida livre resgatados, além de avaliar o hemograma desses animais. Ao total, 115 amostras sanguíneas de gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) oriundos do Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", em Sorocaba, Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres - CeMaCAS, em São Paulo e da Vigilância Ambiental em Saúde, de Botucatu foram analisadas investigando-se a presença de protozoários do gênero *Babesia* e *Hepatozoon* e bactérias do gênero *Ehrlichia*. A partir do material coletado foram realizados hemogramas afim de analisar os valores dos parâmetros hematológicos das duas espécies de hospedeiros, confecção de esfregaços sanguíneos para a procura dos patógenos empregando microscopia óptica, além da utilização de análises moleculares para pesquisa de fragmentos de DNA de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. utilizando-se pares de *primers* específicos para cada patógeno. Nenhuma das lâminas de esfregaço sanguíneo foi positiva para os protozoários pesquisados, porém em uma lâmina foi detectada a presença de mórulas sugestivas de *Ehrlichia* spp. e a amostra era oriunda de *D. albiventris* do município de Sorocaba-SP. Como resultado da análise molecular, cinco (4,34%) amostras foram positivas para *Babesia* spp. e duas (1,73%) foram positivas para *Ehrlichia* spp., todas provenientes do município de Botucatu-SP. Nenhuma amostra foi positiva para protozoários do gênero *Hepatozoon* spp. Empregando ferramentas de bioinformática foi possível confirmar a positividade de *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. Esses resultados ressaltam a importância de novos estudos para melhor compreensão da ocorrência e distribuição de diversos patógenos em populações de animais silvestres.

Palavras-chave: bactérias, biologia molecular, gambás, hemoparasitos, protozoários.

ABSTRACT

Ribeiro, Stephany Rocha. Investigation of *Babesia*, *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in free-living opossums (*Didelphis* sp.) from the State of São Paulo, Brazil. Dissertation (Master in Wild Animals) – São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, p.101, 2024.

As a result of increasing urbanization, there is a negative impact on fauna and flora, leading to ecological imbalances that can trigger the transmission of zoonoses. This study aimed to investigate the presence of hemoparasites in the blood of free-living opossums that were rescued, as well as to evaluate the complete blood count of these animals. A total of 115 blood samples from opossums (*Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita*) were analyzed, originating from the "Quinzinho de Barros" Municipal Zoo in Sorocaba, the Wildlife Management and Conservation Center (CeMaCAS) in São Paulo, and the Environmental Health Surveillance in Botucatu. The presence of protozoa of the genus *Babesia* and *Hepatozoon*, as well as bacteria of the genus *Ehrlichia*, was investigated. From the material collected, blood counts were taken in order to analyze the values of the hematological parameters of the two host species, blood smears were taken to look for pathogens using optical microscopy, and molecular analysis was used to search for DNA fragments of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp. using specific *primer* pairs for each pathogen. None of the blood smear slides were positive for the protozoa investigated, but one slide showed the presence of morulae suggestive of *Ehrlichia* spp. and the sample came from *Didelphis albiventris* in the municipality of Sorocaba-SP. As a result of the molecular analysis, five (4.34%) samples were positive for *Babesia* spp. and two (1.73%) were positive for *Ehrlichia* spp., all samples from the municipality of Botucatu-SP. No samples were positive for protozoa of the genus *Hepatozoon* spp. Using bioinformatics tools, it was possible to confirm the positivity of *Babesia* sp. and *Ehrlichia* sp. These results highlight the importance of further studies to better understand the occurrence and distribution of various pathogens in wild animal populations.

Keyword: bacteria, molecular biology, opossums, hemoparasites, protozoa.

Sumário

CAPÍTULO I.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 GÊNERO <i>Babesia</i>	16
2.2 GÊNERO <i>Hepatozoon</i>	24
2.3 GÊNERO <i>Ehrlichia</i>	29
2.4 INTERLIGAÇÃO ENTRE SERES HUMANOS, ANIMAIS DOMÉSTICOS E ANIMAIS SELVAGENS	35
2.5 GÊNERO <i>Didelphis</i>	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 AUTORIZAÇÕES.....	41
4.2 LOCAIS DE ESTUDO	42
4.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL	45
4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	46
4.5 ANÁLISES MOLECULARES	48
5 RESULTADOS	53
5.1 ECTOPARASITAS.....	54
5.2 HEMOGRAMA	54
5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	56
5.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	58
5.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	61
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTÍFICO	79

ANEXO	96
Anexo 1. Protocolo de Extração de DNA – sangue fenol/clorofórmio	96
Anexo 2. Protocolos das Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR)	97
Anexo 3. Lista das espécies, locais de coleta e seus respectivos municípios de origem.....	99

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas e as ações antropogênicas, como desmatamento e crescimento desordenado das cidades, podem influenciar na quantidade e no alcance geográfico dos vetores responsáveis pela transmissão de patógenos (Carvalho *et al.*, 2020). Como resultado é possível que a prevalência das enfermidades propagadas por esses vetores aumentem à medida que as transformações ambientais acontecem, e essas mudanças podem ter um impacto significativo na epidemiologia das doenças infecciosas (Khasnis e Nettleman, 2005; Rabelo, 2014; Carvalho *et al.*, 2020).

As doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores são uma preocupação significativa no contexto da saúde global e são exemplos a Chikungunya, Dengue, Doença de Chagas, Febre amarela, Febre do Oeste do Nilo, Febre maculosa, Leishmanioses, Malária, Zika vírus, dentre outras (Carvalho *et al.*, 2020; São Paulo, 2022; Codeço *et al.*, 2023; Pinter, 2023; Santos *et al.*, 2024). Os principais artrópodes vetores são os ácaros, carrapatos, piolhos, pulgas e mosquitos (Osório *et al.*, 2019).

Há três hemoparasitoses na medicina veterinária que são causadas por patógenos transmitidos por vetores e se destacam como de grande importância, a babesiose, hepatozoonose e a erliquiose e os agentes são protozoários do gênero *Babesia* e *Hepatozoon* e bactérias do gênero *Ehrlichia* (Spolidorio, 2009; Bittencourt *et al.*, 2022). São patógenos que compartilham o mesmo artrópode vetor, o carrapato-marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) *sensu lato*, principal vetor desses patógenos no Brasil, e podem afetar animais domésticos, selvagens e o homem (Labruna *et al.*, 2007; Spolidorio, 2009; Alves, 2017).

Os Centros de Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres, Parques Zoológicos e Aquários desempenham papel fundamental na conservação da fauna silvestre, resgatando, reabilitando e reintroduzindo animais aptos a retornarem ao seu habitat e cuidando de animais impossibilitados de retornar à natureza, de acordo com a legislação brasileira (IBAMA, 2015; MMA, 2018). Além disso, contribuem para a pesquisa científica, promovem o conhecimento

sobre a biologia e medicina veterinária das espécies, sobre o bem-estar e comportamento animal, realizam pesquisas epidemiológicas e aplicam técnicas de conservação tanto *in situ* quanto *ex situ* (Barros, 2023).

A crescente interação entre seres humanos e animais proporciona benefícios emocionais e físicos, porém sem as medidas sanitárias adequadas pode aumentar o risco de transmissão de zoonoses (Day, 2011; Machado *et al.*, 2019). Decorrente da destruição dos habitats naturais, animais selvagens tem se aproximado de áreas urbanas, intensificando o contato com animais domésticos e seres humanos, o que aumenta o risco de transmissão de patógenos zoonóticos (Khasnis e Nettleman, 2005; Day, 2011; Rabelo, 2014; Carvalho *et al.*, 2020).

Nesse cenário, ressalta-se a relevância do conceito de Saúde Única (One Health), que enfoca a interconexão inseparável entre a saúde humana, animal e ambiental (CRMV-SP, 2021). Esse conceito representa uma visão integrada, e mostra que essa interconexão impacta diretamente em questões como doenças emergentes e reemergentes, zoonoses, globalização, mudanças climáticas e transformações ambientais (Day, 2011; CRMV-SP, 2021).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Babesia*

Agente etiológico e ciclo biológico

Patógenos do gênero *Babesia* spp. são protozoários intraeritrocitários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sarcodina, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae, Gênero *Babesia* e possuem aproximadamente 100 espécies descritas que parasitam animais domésticos, silvestres e o homem (Olicheski, 2003; Brandão e Hagiwara, 2002; Chauvin *et al.*, 2009; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015).

As espécies do protozoário descritas como responsáveis por causar infecção em canídeos domésticos no mundo são a *Babesia canis* e a *Babesia gibsoni* levando ao desenvolvimento da babesiose canina, considerada uma das infecções mais importantes que afeta canídeos domésticos e é causada por

hemoprotozoários transmitidos por carrapatos (Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Pereira *et al.*, 2021).

Caracteres moleculares, patogenicidade, imunidade cruzada, distribuição geográfica e especificidade do vetor são aspectos que foram considerados na diferenciação e classificação de três subespécies da espécie *Babesia canis*, sendo elas *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi* (Uilenberg, 2006; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015). Esses critérios ajudam a compreender a diversidade genética, a distribuição geográfica e a capacidade patogênica desses agentes parasitários. No Brasil, a principal espécie responsável por causar a babesiose canina é a *Babesia canis vogeli* (Soares, 2015).

Babesia canis pertence ao grupo das grandes *Babesias* medindo cerca de 2,4 x 5,1 µm, geralmente estão presentes aos pares no interior dos eritrócitos, apresentando uma conformação piriforme e podendo variar sua posição no interior do citoplasma, estando centralizados ou mais periféricos (Brandão e Hagiwara, 2002; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016).

Babesia gibsoni pertence ao grupo das pequenas *Babesias*, medindo cerca de 1,0 x 3,2 µm, geralmente presentes individualmente no interior dos eritrócitos e apresentando conformação que varia de arredondadas a ovais (Brandão e Hagiwara, 2002; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016).

A prevalência da doença e a sua distribuição geográfica estão diretamente relacionadas à presença do vetor, que se encontra principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Brandão e Hagiwara, 2002; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Pereira *et al.*, 2021).

Exemplares de microorganismos morfolologicamente similares a *B. canis* foram identificados em uma variedade de canídeos selvagens, como cachorros-do-mato, chacais, coiotes, graxains-do-campo, lobos e raposas (Soares, 2015). No entanto, quando se trata de *B. canis vogeli*, o papel dos carnívoros silvestres na epidemiologia da doença é questionável, uma vez que o principal vetor, o carrapato-marrom do cão (*R. sanguineus*), está mais adaptado e é comumente encontrado em ambientes urbanos (Soares, 2015).

Transmissão

A transmissão do protozoário para o hospedeiro ocorre principalmente por meio da inoculação dos esporozoítos presentes na saliva do vetor no momento do repasto sanguíneo, porém, pode ocorrer também por meio de transfusão sanguínea onde o animal doador esteja infectado com o patógeno (figura 1) (Brandão e Hagiwara, 2002; Uilenberg, 2006; Vieira *et al.*, 2013; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

Bounos *et al.*, (1993) sugeriram a ocorrência de transmissão transplacentária ao identificarem *Babesia gibsoni* em esfregaços sanguíneos de uma cadela e seus filhotes que tinham três dias de vida. A transmissão entre os vetores é descrita por Chauvin *et al.*, (2009) como transovariana (vertical) e transestadial (entre as fases de larva, ninfa e adulto) (Taboada *et al.*, 1997; Brandão e Hagiwara, 2002).

O principal vetor da *Babesia canis vogeli* são os carrapatos da espécie *R. sanguineus*, família Ixodidae (Brandão e Hagiwara, 2002; Olicheski 2003; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022). Esse ixodídeo apresenta um ciclo trioxênico e nidícola e tem distribuição geográfica em todo o território nacional, especialmente em ambientes urbanos, o que implica na presença do protozoário em todo o país (Soares, 2015).

Patogenia

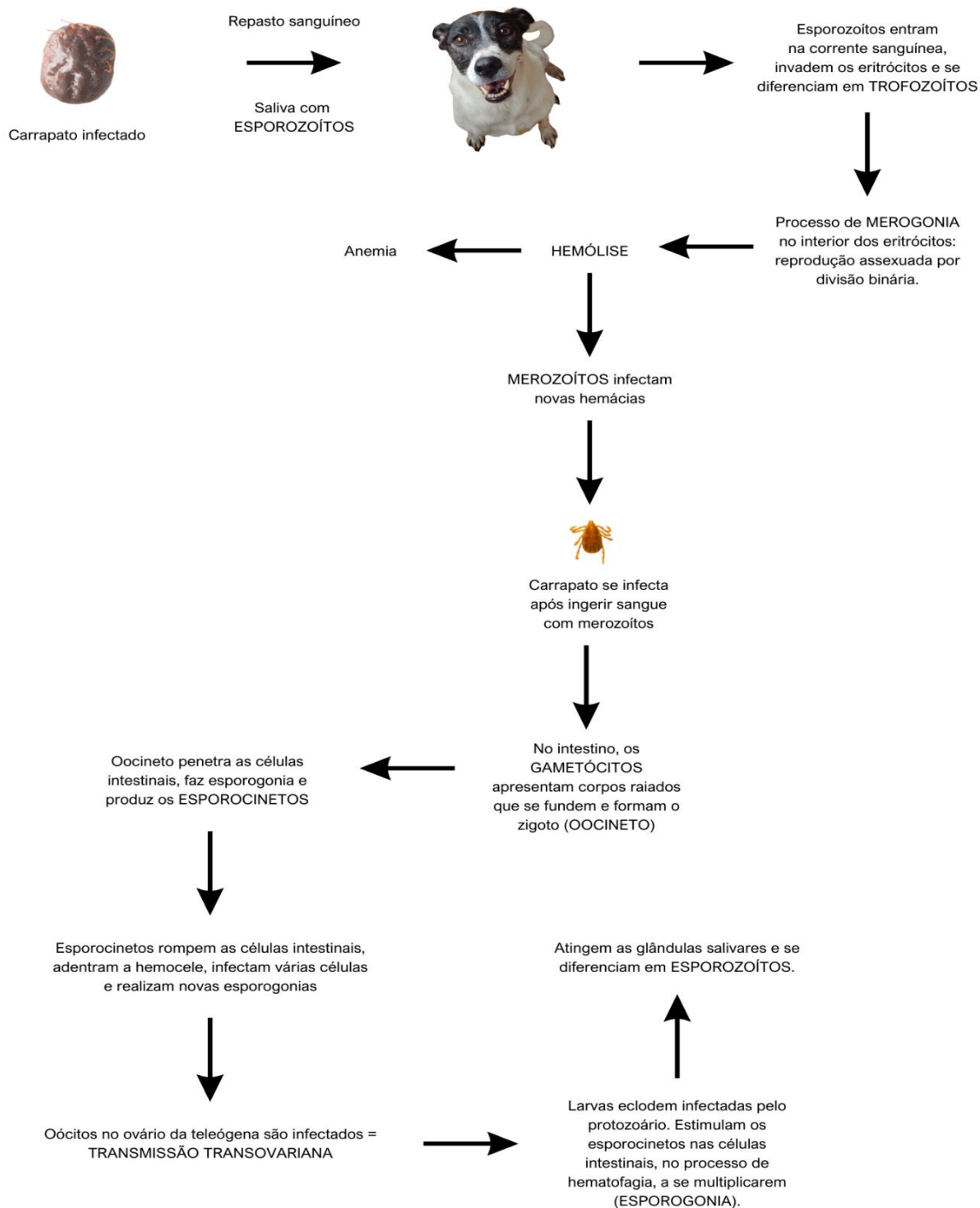
Durante o processo de reprodução do protozoário, que ocorre de forma assexuada no interior dos eritrócitos, as babésias causam a ruptura das hemácias (hemólise), levando a ocorrência de um quadro de anemia hemolítica regenerativa (Olicheski, 2003; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016).

A hemólise, além de causar anemia, desencadeia em liberação de hemoglobina, levando a um quadro de hemoglobinemia, hemoglobinúria e bilirrubinemia, (Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016) e favorece a liberação de pirógenos que causam o aumento da temperatura corporal (Olicheski, 2003; Soares, 2015).

Quadros de hemólise intensa podem causar uma sobrecarga do fígado e desencadear em icterícia, congestão hepática e esplênica além de hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear gerando hepatoesplenomegalia (Olicheski,

2003; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016). A hemoglobínúria intensa também pode levar a quadros de nefropatias, devido a sua nefrotoxicidade (Olicheski, 2003; Soares, 2015).

Decorrente da anemia, a um quadro de hipóxia que aumenta o metabolismo anaeróbico podendo levar ao desenvolvimento de acidose metabólica, com consequente diminuição da oxigenação tecidual (Olicheski, 2003; Soares, 2015). Hipovolemia advinda da ação sistêmica de mediadores inflamatórios, choque endotóxico e infecções sistêmicas ocasionam um quadro irreversível de comprometimento orgânico que pode desencadear na síndrome de disfunção múltipla de órgãos e levar ao óbito (Olicheski, 2003; Soares, 2015).

Figura 1. Ciclo biológico da *Babesia* spp.

Fontes das imagens: Arquivo pessoal / Google imagens

Sinais clínicos e alterações laboratoriais

A babesiose pode se manifestar de formas que variam de subclínica (inaparente), hiperaguda, aguda a crônica (Braga e Silva, 2013; Soares, 2015;

Dias e Ferreira, 2016). Podem ser classificadas clinicamente em não complicada e complicada (Lobetti *et al.*, 2002).

A babesiose não complicada geralmente decorre de uma hemólise de baixa intensidade e resulta em uma doença onde o animal é assintomático ou o hospedeiro apresenta sinais inespecíficos e leves como apatia, anorexia, caquexia, diarreia, febre, letargia, mucosas pálidas e, nesses casos, a anemia pode variar de branda a grave (Lobetti *et al.*, 2002; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

Em casos em que a lise de hemácias é mais intensa pode-se observar anemia intensa, hemoglobinemia, hemoglobinúria, bilirrubinemia, bilirrubinúria, icterícia, pneumonia e óbito (Lobetti *et al.*, 2002; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022). Em alguns casos menos comuns, é relatado a presença de alterações neurológicas como ataxia, desequilíbrio e paralisia, distúrbios respiratórios como taquipneia e dispneia, alterações circulatórias como taquicardia, hipotensão e diminuição do tempo de preenchimento capilar, além de agressividade e extrema apatia (Soares, 2015; Nelson e Couto, 2015).

Segundo Lobetti *et al.*, (2002) a babesiose complicada está associada ao comprometimento de vários órgãos, com sinais específicos indicativos de falência de cada órgão e o envolvimento cerebral, hepático, pulmonar e renal são condições clínicas reconhecidas.

A resposta inflamatória pode levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica resultando na síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (Lobetti *et al.*, (2002). A gravidade das manifestações clínicas e o comprometimento dos órgãos depende de fatores como a intensidade da hemólise, a patogenicidade da cepa envolvida e a susceptibilidade do hospedeiro que incluem a resposta imune do animal, idade e infecções concomitantes (Braga e Silva, 2013; Vieira *et al.*, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016).

As alterações hematológicas mais evidentes e características da babesiose canina são a anemia e a trombocitopenia (Brandão e Hagiwara, 2002; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Moraes *et al.*, 2016). Nos primeiros dias após a infecção é comum a presença de anemia normocítica normocrômica de baixa intensidade que pode tornar-se anemia macrocítica hipocrômica regenerativa com a progressão da doença (Braga e Silva, 2013; Dias e Ferreira, 2016). Em

alguns casos, reticulocitose pode ser observada e essas alterações são resultados da presença de hemácias jovens na corrente sanguínea, necessárias devido à crescente destruição de eritrócitos, tanto pela ação direta do parasita quanto pela atividade do sistema fagocítico (Soares, 2015).

Ainda é possível observar hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobínúria, trombocitopenia, acidose metabólica, azotemia, cilindros renais e reticulocitose, que é proporcional à gravidade da anemia (Braga e Silva, 2013; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

As alterações leucocitárias são variáveis, podendo resultar em um aumento ou diminuição na contagem de glóbulos brancos (Braga e Silva, 2013). Soares (2015) defende que a leucocitose por neutrofilia é a alteração mais comumente encontrada.

Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose canina pode ser realizado por meio da avaliação dos sinais clínicos associados a exames complementares. Estes podem incluir exames diretos, como o esfregaço sanguíneo e testes moleculares, além de exames indiretos, como testes sorológicos (Brandão e Hagiwara, 2002; Silva *et al.*, 2011; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

O esfregaço sanguíneo é um exame de triagem importante no diagnóstico desta hemoparasitose, é empregado durante a fase aguda da doença (parasitemia) e o teste é realizado com uma gota de sangue periférico (Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Pereira *et al.*, 2021). O exame baseia-se em verificar a presença do protozoário na lâmina (Soares, 2015). Apesar de sua rapidez, alta viabilidade, baixo custo e alta conclusividade, este método possui baixa sensibilidade quando a parasitemia está reduzida (Brandão e Hagiwara, 2002; Silva *et al.*, 2011; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Pereira *et al.*, 2021; Bittencourt *et al.*, 2022).

O diagnóstico baseado em testes moleculares empregando Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) visa buscar fragmentos de DNA do patógeno em amostras biológicas (sangue ou fragmentos de órgãos). Esse teste demonstra maior especificidade e sensibilidade, permitindo detectar o agente mesmo em situações de baixa parasitemia, além de possibilitar a distinção entre as espécies

e subespécies do protozoário (Brandão e Hagiwara, 2002; Olicheski 2003; Soares, 2015; Bittencourt *et al.*, 2022). No entanto, esse método diagnóstico é mais comumente empregado em pesquisas e estudos epidemiológicos (Brandão e Hagiwara, 2002; Olicheski 2003; Silva *et al.*, 2011; Braga e Silva, 2013; Dias e Ferreira, 2016).

Os testes sorológicos são métodos indiretos que se baseiam na pesquisa de anticorpos antibabésia circulantes e podem ser empregados durante as fases subaguda ou crônica da doença, quando a parasitemia é baixa e as provas sorológicas mais empregadas são o ensaio imunoenzimático – ELISA e a reação de imunofluorescência indireta – RIFI (Brandão e Hagiwara, 2002; Olicheski, 2003; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

A RIFI tem sido amplamente utilizada por sua alta sensibilidade e moderada especificidade, conforme Soares (2015), com uma titulação de “corte” de 1:40, além de seu baixo custo e fácil operacionalidade (Brandão e Hagiwara, 2002; Olicheski, 2003; Dias e Ferreira, 2016),

No entanto, Braga e Silva (2013) apontam limitações em sua especificidade devido a possibilidade de resultados falso-positivos, que podem ocorrer devido à exposição prévia ao patógeno ou reações cruzadas, e falso-negativos, que podem acontecer em casos de infecções recentes devido ao tempo necessário para detecção de anticorpos anti-*Babesia* pós infecção (cerca de 5-10 dias pós infecção).

Bittencourt *et al.*, (2022) sugerem que possa ocorrer reações cruzadas, sendo difícil diferenciar entre infecções ativas e infecções prévias. O método sorológico ELISA apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade (Soares, 2015).

Deve-se ter cautela ao interpretar os resultados dos testes sorológicos e correlacioná-los com as manifestações clínicas do hospedeiro, bem como os dados laboratoriais, especialmente a contagem de plaquetas (Olicheski, 2003; Dias e Ferreira, 2016).

Potencial zoonótico

A babesiose humana é uma zoonose que foi descrita em países do continente Europeu e Americano e trata-se de uma infecção geralmente branda

ou assintomática, porém em alguns casos pode levar a quadros graves incluindo óbito (Brandão e Hagiwara, 2002).

Segundo Brandão e Hagiwara (2002), os seres humanos parecem atuar como hospedeiros acidentais da doença, pois não parece haver uma espécie de *Babesia* spp. que cause infecção exclusivamente em humanos. O diagnóstico deve ser cuidadoso pois a infecção por protozoários do gênero *Babesia* spp. se assemelha à infecção por *Plasmodium* spp., causador da Malária (Alecrim *et al.*, 1983; Olicheski, 2003).

O primeiro caso de infecção humana por protozoários do gênero *Babesia* spp. no Brasil foi relatado por Alecrim *et al.*, (1983) por meio de exame direto em lâminas de esfregaço sanguíneo, de um homem que trabalhava como auxiliar veterinário no estado do Pernambuco e havia sido diagnosticado previamente com malária.

As espécies de maior importância para os seres humanos são a *B. microti*, *B. bovis* e a *B. divergens*, os sintomas apresentados podem variar de leves como febre, calafrios e sudorese noturna, a quadros mais graves e fatais em pacientes imunocomprometidos e as alterações laboratoriais esperadas são anemia, hemoglobinúria, proteinúria, aumento discreto de ureia, creatinina, bilirrubinas totais e frações e desidrogenase láctica (LDH) (Castro e Minkoves, 1999).

2.2 GÊNERO *Hepatozoon*

Agente etiológico e ciclo biológico

O gênero *Hepatozoon* spp. faz parte de um grupo de hemogregarinas pertencentes ao Filo Apicomplexa, em conjunto com outros três gêneros (*Haemogregarina*, *Karyolysos* e *Cyrtospora*) e possui cerca de 300 espécies descritas (Smith, 1996; Kubo *et al.*, 2008; Telford, 2010). Está classificado taxonomicamente como pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Adeleorina, Família Hepatozoidae e Gênero *Hepatozoon* spp (Smith, 1996; Kubo *et al.*, 2008; Telford, 2010).

Até o momento, as espécies de *Hepatozoon* que se destacam infectando mamíferos incluem o *Hepatozoon canis*, presente na Europa, Ásia, África, Oriente Médio e América do Sul, e o *Hepatozoon americanum*, cuja ocorrência

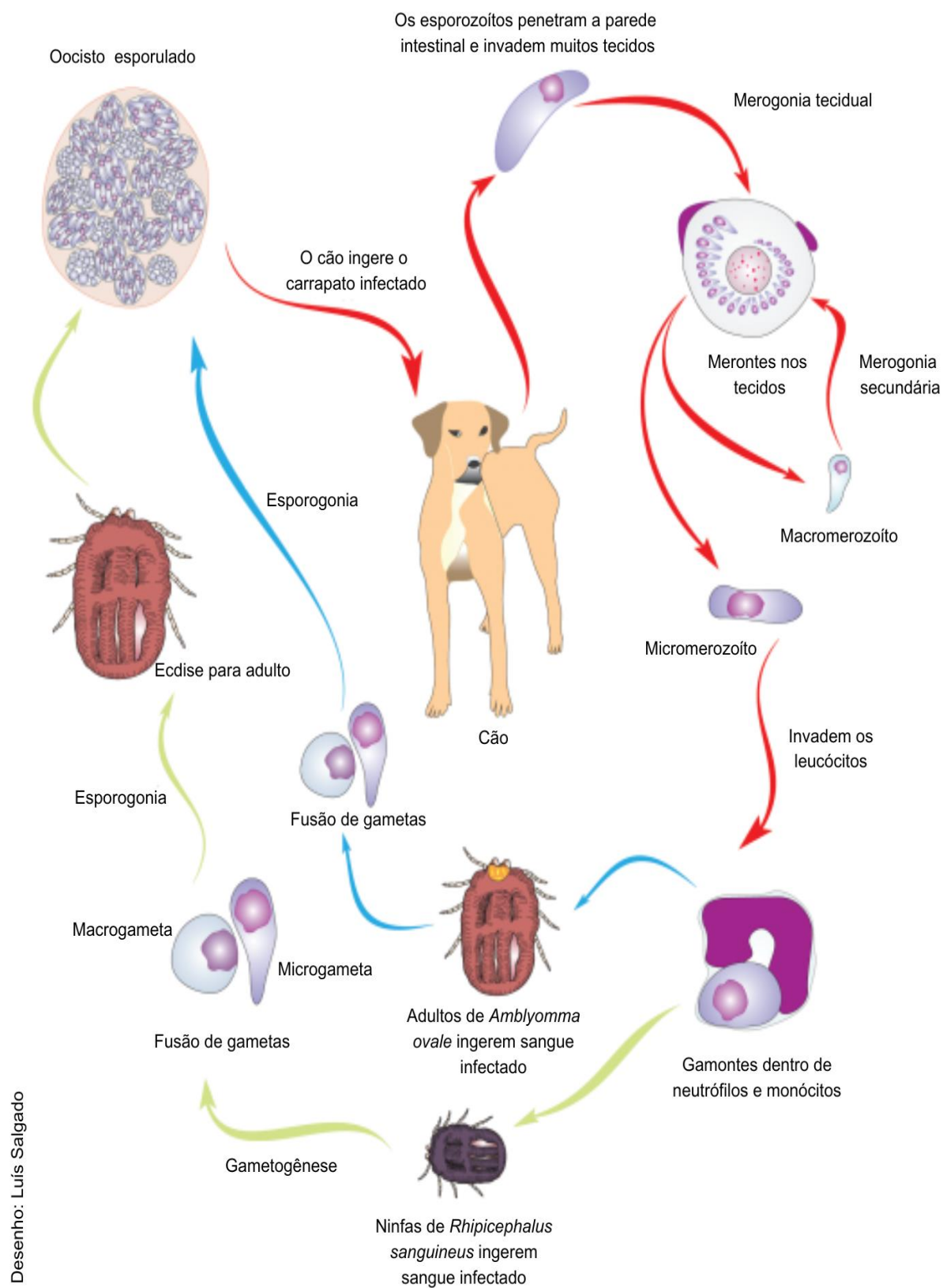
foi descrita exclusivamente nos Estados Unidos. (Baneth *et al.*, 2003; O'Dwyer, 2011).

O ciclo do protozoário é bem definido para canídeos domésticos (figura 2), porém ainda não possui sua descrição esclarecida para outras espécies de mamíferos e os sinais clínicos em mamíferos silvestres ainda seguem desconhecidos (O'Dwyer, 2011).

Nos hospedeiros invertebrados definitivos, ocorre a fase de desenvolvimento sexuado e esporogonia, ocorrendo desenvolvimento de oocistos poliesporocísticos (O'Dwyer, 2011). Nos hospedeiros vertebrados intermediários ocorre merogonia seguida de gamontogonia, sendo que o estágio de gamonte ocorre nas células sanguíneas (nas hemácias de aves e répteis e nos leucócitos dos mamíferos) (O'Dwyer, 2011).

Vários animais pertencentes à classe Mammalia foram identificados como hospedeiros vertebrados para parasitas do gênero *Hepatozoon*, incluídos nas ordens Carnívora, Chiroptera, Dasyuromorphia, Didelphimorphia, Diprotodontia, Hyracoidea, Lagomorpha, Microbiotheria, Peramelemorphia, Rodentia e Soricomorpha (Smith, 1996; Merino *et al.*, 2009; Santos, 2020; Marques *et al.*, 2022). O patógeno foi encontrado nos seis biomas brasileiros – Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Marques *et al.*, 2022).

Figura 2. Ciclo biológico do *Hepatozoon canis*.



Fonte: O'Dwyer, 2011, com adaptações (traduzido do inglês).

Transmissão

A transmissão do protozoário ocorre principalmente por meio da ingestão do hospedeiro invertebrado definitivo infectado e contendo oocistos (Smith, 1996), mas também pode ocorrer secundariamente pela predação de um hospedeiro vertebrado intermediário infectado contendo cistos (Baneth *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2014; Mendoza-Roldan *et al.*, 2021) pois o ciclo presa-predador leva à infecção do predador ao se alimentar da presa infectada pelo parasita (Johnson *et al.*, 2008).

A transmissão via presa-predador foi descrita em canídeos e felinos silvestres e serpentes no Continente Africano e na Bacia do Mediterrâneo (Tomé *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2020), répteis em Madagascar (Maia *et al.*, 2014), roedores no Brasil (Perles, 2019), e Johnson *et al.*, (2008) descreveram a transmissão de *Hepatozoon americanum* mediante a predação de um hospedeiro vertebrado paratênico.

Os hospedeiros invertebrados definitivos mais comuns são os carrapatos, ácaros, pulgas e dípteros hematófagos, que atuam como vetores (Smith, 1996; Merino *et al.*, 2009; Ribeiro, 2019; Mendoza-Roldan *et al.*, 2021; Santos, 2020; Marques *et al.*, 2022). O vetor primário do *Hepatozoon canis* no Brasil é o carrapato *R. sanguineus*, conhecido popularmente como carrapato-marrom do cão. Esta espécie de carrapato é amplamente distribuída em diversas regiões do país e é considerada o vetor mais importante na transmissão do patógeno entre os canídeos domésticos (O'Dwyer *et al.*, 2009).

No entanto, é importante mencionar que há controvérsias nesse assunto, pois alguns estudos também relatam a presença de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. em mamíferos infectados por *Hepatozoon canis*. (O'Dwyer *et al.*, 2001; Forlano *et al.*, 2005, 2007; Criado-Fornelio *et al.*, 2006).

Sinais clínicos e achados laboratoriais

A infecção por *Hepatozoon canis* geralmente resulta em uma doença com caráter subclínico e em muitos casos, por apresentarem baixa parasitemia, os animais afetados são assintomáticos (Spolidorio *et al.*, 2009; Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011). Diferentemente do relatado em infecções por *Hepatozoon americanum* que comumente leva a quadros debilitantes e fatais (Baneth, 2011).

No entanto, alguns sinais clínicos podem ser observados, como anorexia, perda de peso, letargia, palidez de mucosas, apatia, vômito, diarreia, febre, secreção ocular, poliúria, polidipsia e alterações na marcha (Mundim *et al.*, 1994, 2008; Gondim *et al.*, 1998; Paludo *et al.*, 2003, 2005). Esses padrões foram observados em áreas onde a prevalência da infecção por *Hepatozoon canis* têm sido relatada. Fatores como idade do animal, imunossupressão e/ou infecções concomitantes podem contribuir para agravar os sintomas da Hepatozoonose (Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011; Spolidorio *et al.*, 2009).

Até o momento, não há total clareza sobre o impacto causado pelo *Hepatozoon* spp. em animais silvestres, porém alguns estudos associaram a presença do patógeno à doença clínica em hienas e coiotes (Kocan *et al.*, 2000; East *et al.*, 2008).

Diversos estudos destacam achados laboratoriais associados à infecção por *Hepatozoon* spp., que podem incluir anemia, leucocitose por neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (Gondim *et al.*, 1998; Mundim *et al.*, 2008). Além disso, foram observadas alterações bioquímicas, como aumento nos níveis de ureia, fosfatase alcalina e creatina quinase (Gondim *et al.*, 1998). Em casos de baixa parasitemia, cães positivos podem não apresentar nenhuma alteração hematológica significativa (Paludo *et al.*, 2003; O'Dwyer *et al.*, 2006).

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* spp. pode ser realizado por meio de diversos exames complementares, tais como testes sorológicos para detecção de anticorpos, exame histopatológico (realizado *post mortem*), teste parasitológico e análise molecular (Baneth *et al.*, 2003; O'Dwyer *et al.*, 2006; O'Dwyer, 2011; Otranto *et al.*, 2011; Perles, 2019).

A detecção de anticorpos de animais infectados por *Hepatozoon* spp. antes da formação de merontes pode ser uma estratégia para identificar a presença do parasita em estágios iniciais da infecção ou em casos de baixa parasitemia (Baneth *et al.*, 1998). Isso é especialmente relevante quando se considera que a formação de merontes pode levar algum tempo após a infecção inicial – cerca de 13 dias, segundo um estudo experimental (O'Dwyer, 2011).

O diagnóstico da hepatozoonose pode ser realizado também mediante exame *post mortem*, por meio do exame histopatológico ou citologia, pois em

casos de infecção pelo protozoário há a presença de cistos em alguns órgãos como baço, fígado e medula óssea, porém ausentes nos músculos (Baneth *et al.*, 2003; O'Dwyer, 2011). Otranto *et al.*, (2011) relatam sua preferência pela citologia da camada leucocitária em detrimento do esfregaço sanguíneo.

O teste parasitológico (esfregaço sanguíneo) é amplamente utilizado como técnica diagnóstica de infecções causadas por patógenos do gênero *Hepatozoon* spp. (Marques *et al.*, 2022) e envolve a visualização dos gamontes dentro das células sanguíneas infectadas (Baneth *et al.*, 2003; O'Dwyer *et al.*, 2006). Embora essa metodologia permita a detecção dos gamontes, a simples morfologia não possibilita a diferenciação de espécies e, além disso, em casos de baixa parasitemia ou infecção intermitente, os gamontes podem não ser detectados, portanto, o teste apresenta baixa sensibilidade (Baneth *et al.*, 1998; O'Dwyer, 2011; Perles, 2019).

A Hepatozoonose também pode ser diagnosticada por meio da PCR, técnica reconhecida por sua alta sensibilidade e especificidade. Atualmente, é amplamente empregada para o diagnóstico preciso da infecção. (Almeida *et al.*, 2013; Demoner *et al.*, 2016; da Silva *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Otranto *et al.*, 2011; Perles, 2019). No entanto, ainda não integra a rotina clínica hospitalar, sendo mais comumente empregada em pesquisas e estudos epidemiológicos.

2.3 GÊNERO *Ehrlichia*

Agente etiológico e ciclo biológico

Bactérias do gênero *Ehrlichia* pertencem à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, são intracelulares obrigatórios, infectam principalmente leucócitos (macrófagos, monócitos e neutrófilos) de mamíferos, são morfologicamente caracterizadas como GRAM negativas, pleomórficas, com parede celular não proteica e ausente de lipopolissacarídeo de peptidoglicano (Aguilar, 2015; Taques, 2020; Armando, 2022; Bittencourt *et al.*, 2022).

O gênero possui seis espécies descritas, sendo elas *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. minasensi*. A *Ehrlichia canis* foi a única espécie do gênero isolada em cães no Brasil (Aguilar, 2015; Taques, 2020; Armando, 2022).

Infectam mamíferos e algumas espécies da bactéria naturalmente acometem canídeos, equídeos, ruminantes e o homem e raramente infectam gatos (Aguiar, 2015). Nos carrapatos a bactéria infecta as células intestinais, hemocèle e das glândulas salivares (Taques, 2020). A infecção pela bactéria *Ehrlichia canis* leva ao desenvolvimento da erliquiose monocítica canina (EMC), considerada a principal doença canina transmitida por carrapatos no Brasil (Spolidorio *et al.*, 2010; Bittencourt *et al.*, 2022).

Transmissão

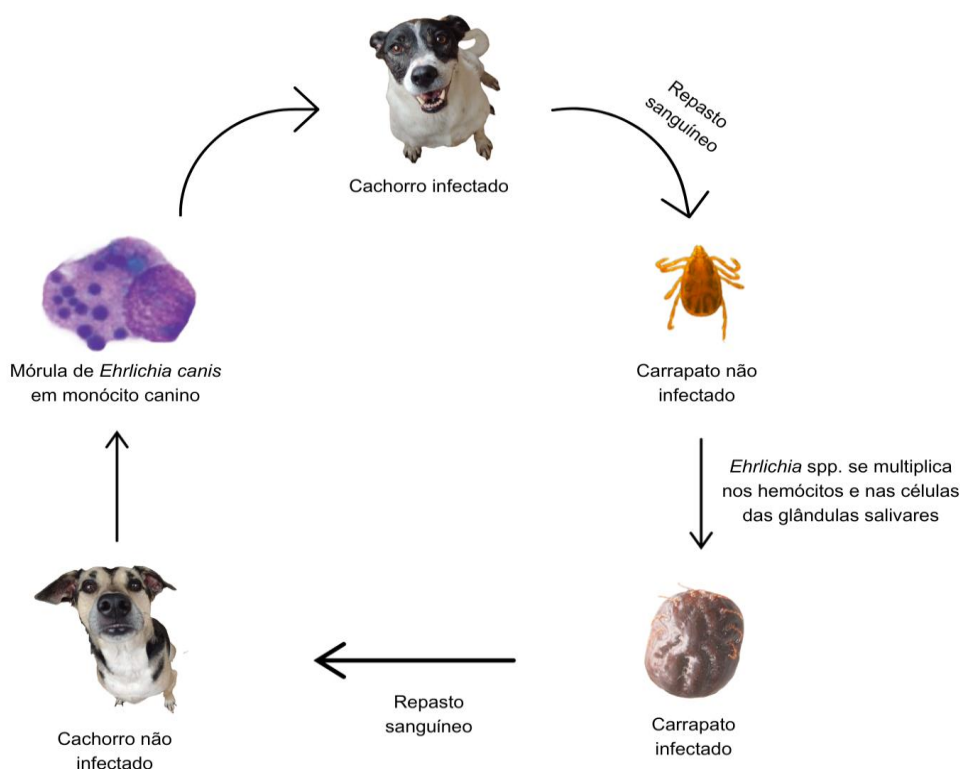
A transmissão da bactéria é realizada durante o repasto sanguíneo pelos carrapatos ixodídeos do gênero *R. sanguineus*, que apresentam ciclo trioxeno, hábito nidícola e possui distribuição geográfica descrita em quase todo o território nacional, principalmente em áreas urbanas, significando provavelmente que a bactéria esteja amplamente distribuída por todo o país (Aguiar, 2015; Armando, 2022; Bittencourt *et al.*, 2022). Há também descrição de transmissão do agente durante transfusões sanguíneas (Aguiar, 2015; Armando, 2022; Bittencourt *et al.*, 2022).

No vetor, a transmissão do patógeno não ocorre de forma vertical, transovariana, ou seja, as larvas de *R. sanguineus* não transmite a bactéria (Aguiar, 2015; Armando, 2022). No entanto, ocorre transmissão transestadial, o que significa que as fases de ninfa e adultos são responsáveis pela transmissão do patógeno (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Patogenia

Durante o repasto sanguíneo o carrapato transmite a bactéria para o hospedeiro, porém, há necessidade de que o carrapato fique fixado no hospedeiro por algumas horas para aumentar a temperatura e reativar o patógeno (Aguiar, 2015). O agente penetra nas células mononucleares de defesa como corpúsculos elementares e se multiplica em dois estágios, os corpúsculos iniciais e as mórulas (figura 3) (Aguiar, 2015; Armando, 2022). O período de incubação da bactéria é de oito a 20 dias e a doença é classificada em fase aguda, subclínica e crônica (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Figura 3. Ciclo biológico da *Ehrlichia* spp.



Fontes das imagens: Arquivo pessoal / Google imagens

Na fase aguda da doença, que tem duração entre duas à quatro semanas, por haver a presença de muitas bactérias na corrente sanguínea, o hospedeiro atua como fonte de infecção (Armando, 2022). Protegida no interior da célula, a bactéria circula pelo organismo através da corrente sanguínea e atinge outros órgãos como o baço, linfonodos e fígado, causando manifestações clínicas inespecíficas como esplenomegalia, linfadenomegalia e hepatomegalia (Aguilar, 2015; Armando, 2022).

Na fase subclínica, o hospedeiro é assintomático, geralmente encontram-se alterações hematológicas discretas e há uma intensa estimulação antigênica, aumentando a resposta humoral e levando à produção de anticorpos (Aguilar, 2015; Armando, 2022). Nesse momento, processos de ricketsemia podem ser desencadeados inúmeras vezes, o que facilita a infecção de novos carrapatos (Aguilar, 2015).

Na fase crônica, que pode se estender por anos, os sinais clínicos são mais pronunciados, facilitando o diagnóstico da doença devido à presença do agente na corrente sanguínea (Aguilar, 2015; Armando, 2022).

Sinais clínicos e achados laboratoriais

A bactéria não possui predileção por idade nem sexo e o grau de virulência depende das diferentes cepas de *Ehrlichia* spp., sendo que a forma mais grave geralmente acomete animais imunossuprimidos (Nelson e Couto, 2015). Os sinais clínicos são inespecíficos podendo ser confundida com outras enfermidades, aumentam à medida que a infecção progride ao longo do tempo (Armando, 2022) e a doença apresenta três fases: aguda, subclínica e crônica (Aguiar, 2015).

Na fase aguda da doença o animal pode ser assintomático ou apresentar sinais inespecíficos, que se iniciam após 14 dias da infecção, como apatia, anorexia, hipertermia, letargia, perda de peso e taquipneia, e alguns sinais mais graves como febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e organomegalia em baço secundária à replicação leucocitária nesses órgãos, além de equimoses, petéquias e sufusões na pele secundária à trombocitopenia e vasculite (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

A fase subclínica pode se estender por meses ou anos, o animal apresenta sinais discretos a imperceptíveis e é nessa fase que ocorre a elevação dos anticorpos (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Na fase crônica, que pode ocorrer meses ou anos pós infecção, as manifestações clínicas são mais graves e podem levar o animal ao óbito (Aguiar, 2015). Pode-se observar edema periférico, emaciação e pancitopenia que desencadeiam em mucosas hipocoradas, além de hipertermia, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia (Aguiar, 2015; Armando, 2022). Podem ocorrer alterações reprodutivas em animais não castrados como edema de escroto nos machos, período prolongado de estro nas fêmeas, infertilidade, abortos e mortes neonatais (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Outras manifestações clínicas comuns são as alterações oculares e os sinais neurológicos, sendo as mais comuns observadas o deslocamento de retina, hemorragia subretinal, hifema, uveíte e a cegueira e ataxia, convulsões, disfunção neuromotora e vestibular central ou periférica, hiperestesia e meningoencefalite (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Dentre as alterações hematológicas encontradas, a trombocitopenia é a mais frequentemente observada (Aguiar, 2015). Além disso é observado

também a diminuição da agregação plaquetária, pancitopenia com ausência de danos na medula óssea, redução de eritrócitos e hemoglobina sérica, anemia não regenerativa na fase aguda (Aguiar, 2015; Armando, 2022). Na avaliação leucocitária encontra-se leucopenia, neutrofilia com desvio a esquerda, linfopenia causada pela ação dos glicocorticoides endógenos e durante a fase aguda é mais comum detectar mórulas nos esfregaços sanguíneos (Aguiar, 2015).

A anemia identificada nas avaliações hematológicas resulta de uma hipoplasia medular (diminuição da produção de células sanguíneas na medula óssea), que pode progredir para aplasia medular, e ocorre na fase crônica da enfermidade, sendo a principal causa de morte associada à doença (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

Decorrente do aumento das globulinas, no exame bioquímico observa-se variados graus de hipoalbuminemia e hiperproteinemia que levam à diminuição da relação albumina/globulina (Aguiar, 2015). Outros achados bioquímicos comuns na doença são consequentes aos danos teciduais hepáticos e renais, onde observa-se níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT), creatinina, fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH) e ureia (Aguiar, 2015).

Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose pode ser obtido por meio da análise dos sinais clínicos apresentados pelo animal associados a exames complementares. Estes podem incluir métodos diretos para verificar a presença do antígeno, como o esfregaço sanguíneo, testes moleculares e isolamento, além de métodos indiretos que verificam a presença do anticorpo, como os testes sorológicos (Armando, 2022).

O esfregaço sanguíneo é um método diagnóstico direto que se baseia na visualização de mórulas de *Ehrlichia* spp. no interior de monócitos circulantes dos animais infectados (Armando, 2022). O teste é mais eficaz quando empregado durante a fase aguda da doença, onde há bactérias circulantes no sangue periférico, e possui baixa sensibilidade quando a parasitemia está reduzida (Aguiar, 2015).

O diagnóstico baseado na PCR o qual se baseia na pesquisa de fragmentos de DNA da bactéria em amostras biológicas do hospedeiro,

demonstra maior especificidade e sensibilidade pois permite detectar o patógeno mesmo em quadros de baixa parasitemia, quando ainda não teve formação de mórulas nem soroconversão (Aguiar, 2015; Taques, 2020).

O cultivo celular para isolamento da bactéria a partir de amostras sanguíneas é considerado o método diagnóstico mais sensível, porém leva cerca de 30 dias para se obter o resultado então, dessa forma, esta técnica é mais utilizada para fins de pesquisa (Aguiar, 2015).

Os testes sorológicos são métodos indiretos que se baseiam na pesquisa de anticorpos que indicam que o animal teve contato com o antígeno em algum momento prévio (Armando, 2022). O ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado em clínicas e hospitais veterinários e trata-se de um teste rápido que detecta anticorpos específicos (Armando, 2022). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é a prova sorológica mais empregada para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* devido a sua alta sensibilidade, e utiliza o soro sanguíneo como amostra para análise (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

No entanto, é importante interpretar os resultados dos exames sorológicos com cautela e em associação as manifestações clínicas e outros exames laboratoriais, pois um resultado positivo indica apenas que o animal teve contato com o patógeno em algum momento prévio e não necessariamente está em processo ativo de infecção (Aguiar, 2015).

Potencial zoonótico

O primeiro relato de seres humanos infectados por bactérias do gênero *Ehrlichia* spp. na América do Sul ocorreu na Venezuela (Perez *et al.*, 1996). Dentre as espécies do gênero, três foram descritas infectando seres humanos, sendo elas a *E. canis*, *E. chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* (Perez *et al.*, 1996; Bouza-Mora *et al.*, 2016; Armando, 2022).

O primeiro relato de *E. canis* infectando humanos ocorreu em 1996 na Venezuela, por meio de análises sorológicas e moleculares (Perez *et al.*, 1996). Bouza-Mora *et al.*, (2016) relataram o primeiro diagnóstico confirmado de *E. canis* em humanos na América Central, por meio de uma pesquisa conduzida na Costa Rica e baseada em análises moleculares de humanos doadores de sangue.

Erliquiose Monocítica Humana (EMH) é uma doença infecciosa que possui como agente etiológico a bactéria *Ehrlichia chaffeensis*. É transmitida pelo carrapato-estrela (*Amblyomma americanum*) sendo amplamente distribuída na América do Norte (Aguiar, 2015; Taques, 2020) e considerada como a principal espécie do gênero a parasitar humanos (Bouza-Mora *et al.*, 2016). A infecção em humanos depende da presença do vetor (*A. americanum*) e do hospedeiro reservatório (*Odocoileus virginianus* – cervo-de-cauda-branca) (Bouza-Mora *et al.*, 2016).

A Erliquiose Granulocítica Humana (EGH) e a Erliquiose Granulocítica Canina (EGC) são infecções caracterizadas pelo parasitismo dos neutrófilos pela bactéria *Ehrlichia ewingii*, transmitida pelo carrapato-estrela (*Amblyomma americanum*) na América do Norte, embora existam relatos de transmissão por *R. sanguineus*, o que amplia as possibilidades de sua ocorrência no Brasil (Aguiar, 2015). A infecção por essa bactéria é menos comum (Bouza-Mora *et al.*, 2016).

O parasitismo de humanos por essas espécies de bactérias vem se tornando de grande importância para a saúde pública e é crucial manter a vigilância epidemiológica em locais onde se tenha a proximidade do ser humano com os patógenos, somado a presença vetor e do hospedeiro (Aguiar 2015; Bouza-Mora *et al.*, 2016).

2.4 INTERLIGAÇÃO ENTRE SERES HUMANOS, ANIMAIS DOMÉSTICOS E ANIMAIS SELVAGENS

A interação entre animais e seres humanos tem aumentado com o passar do tempo e os animais de companhia desempenham papel significativo na vida das pessoas, tanto como apoio emocional quanto na saúde física (Alves, 2019; Cardoso e Carvalho, 2021). No entanto, a ausência da posse responsável e de cuidados médicos veterinários, como vacinação e controle parasitário, podem levar ao aumento do risco de transmissão de zoonoses visto que alguns animais vivem em sistema semi domiciliado e podem carrear parasitas, como pulgas e carrapatos, do ambiente externo para dentro de casa (Day, 2011; Machado *et al.*, 2019).

A interação entre o agente causador, o hospedeiro suscetível e o ambiente são componentes da tríade epidemiológica das doenças transmissíveis, sendo o agente biológico um organismo capaz de causar uma infecção, e o hospedeiro o organismo que abriga o agente infeccioso e fornece um ambiente propício para sua sobrevivência e multiplicação (BRASIL, 2010).

O aumento da globalização leva à disseminação de doenças entre diferentes regiões geográficas e as alterações ambientais acarretam a destruição de habitats naturais, podendo levar os animais selvagens a se aproximarem de áreas urbanas, aumentando o contato com seres humanos e animais domésticos com consequente aumento na transmissão de patógenos zoonóticos (Khasnis e Nettleman, 2005; Day, 2011; Rabelo, 2014; Carvalho *et al.*, 2020).

No Brasil, a detecção de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. em gambás foi relatada em outros estudos, como pode ser observado na tabela 1 (Melo *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2018; Colle *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2021; André *et al.*, 2022; Weck, 2022).

Tabela 1. Distribuição dos patógenos em gambás, biomas brasileiros e técnicas de diagnóstico utilizadas.

Patógeno	Espécie	Bioma	Técnica	Autor
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>D. albiventris</i> e <i>D. aurita</i>	Mata Atlântica	Sorológica	Melo <i>et al.</i> , 2016
<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>D. albiventris</i>	Cerrado + Mata Atlântica	Microscopia + Molecular	Silva <i>et al.</i> , 2017
<i>Babesia</i> spp.	<i>D. marsupialis</i>	Amazônia	Molecular	Soares <i>et al.</i> , 2017
<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>D. albiventris</i>	Pantanal	Molecular	Sousa <i>et al.</i> , 2017
<i>Ehrlichia</i> sp.	<i>D. albiventris</i>	Mata Atlântica	Molecular	Lopes <i>et al.</i> , 2018
<i>Babesia</i> spp. e <i>Hepatozoon</i> spp.	<i>D. marsupialis</i>	Amazônia	Molecular	Colle <i>et al.</i> , 2019
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>D. aurita</i>	Mata Atlântica	Molecular	Guimarães <i>et al.</i> , 2019
<i>Babesia</i> sp.	<i>D. albiventris</i>	Cerrado	Microscopia + Molecular	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>D. albiventris</i>	Cerrado	Molecular	André <i>et al.</i> , 2022
<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>D. aurita</i>	Cerrado + Mata Atlântica	Molecular	Weck, 2022

Fonte: Própria autora

2.5 GÊNERO *Didelphis*

A Ordem Didelphimorphia é composta por mamíferos marsupiais e atualmente compreende em sua totalidade 19 gêneros e 95 espécies presentes no continente americano sendo que, no Brasil, são descritos 16 gêneros e 55 espécies (Nascimento e Horta, 2014). O gênero *Didelphis*, família *Didelphidae*, possui seis espécies descritas: *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta*, *D. marsupialis*, *D. pernigra* e *D. virginiana* sendo que, no Brasil, há ocorrência das quatro primeiras espécies citadas (tabela 2) (Nascimento e Horta, 2014).

São popularmente conhecidos como gambás, gambá-de-orelha-preta, gambá-de-orelha-branca, gambá-comum, saruê, seriguê, seriguê, cassaco, timbó, raposinha, dentre outros nomes populares que variam de acordo com a região do país (Nascimento e Horta, 2014).

Os representantes deste Gênero possuem hábitos crepusculares/noturnos, arborícolas, oportunistas, solitários (se aproximando em períodos de época reprodutiva para acasalamento), hábitos alimentares generalistas e são considerados animais sinantrópicos pois apresentam a capacidade de se adaptarem a diferentes ambientes, inclusive os modificados pelo homem, se beneficiando de recursos como alimento e abrigo (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento e Horta, 2014; Bezerra-Santos *et al.*, 2021).

As espécies do Gênero possuem ampla distribuição geográfica no continente americano sendo encontrado do sul do Canadá ao sul da Argentina, e a única espécie descrita em clima temperado é a *Didelphis virginiana* (Gambá-da-Virgínia), encontrada em regiões da América do Norte e Central (Nascimento e Horta, 2014).

Didelphis albiventris, popularmente conhecido como gambá-de-orelha-branca, é uma espécie de marsupial extremamente adaptável e pode ser encontrada em todos os biomas e regiões brasileiras (Costa *et al.*, 2021). Já *Didelphis aurita*, popularmente conhecido como gambá-de-orelha-preta, possui sua principal distribuição no bioma Mata Atlântica, no entanto, embora menos comum, também está presente no Cerrado, principalmente em regiões de transição (Astúa *et al.*, 2021). De acordo com a IUCN e com a Portaria MMA nº 148, o status de conservação dessas duas espécies é considerado “menos preocupante” (Astúa *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2021; BRASIL, 2022).

Tabela 2. Relação das espécies descritas do gênero *Didelphis*, distribuição geográfica e status de conservação segundo a IUCN.

Espécie	Distribuição geográfica	Status de Conservação (IUCN)
<i>D. albiventris</i>	Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai	Pouco preocupante (LC)
<i>D. aurita</i>	Nordeste da Argentina, leste do Brasil e sudeste do Paraguai	Pouco preocupante (LC)
<i>D. imperfecta</i>	Pequenas extensões na Venezuela, Brasil, Suriname e Guianas	Pouco preocupante (LC)
<i>D. marsupialis</i>	Trinidad e Tobago, Guianas, México e Bacia Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela)	Pouco preocupante (LC)
<i>D. pernigra</i>	Toda região dos Andes	Pouco preocupante (LC)
<i>D. virginiana</i>	América do Norte e América Central (Canadá, EUA, México, Belize, Costa Rica, Nicarágua, Guatemala, Honduras e El Salvador)	Pouco preocupante (LC)

Fonte: Própria autora

O gambá desempenha importante papel ecológico como dispersor de sementes, atuando no reflorestamento e como controlador de pragas por se alimentar de insetos e animais peçonhentos, além de auxiliar na limpeza do ambiente ao se alimentar de animais mortos (figura 4) (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento e Horta, 2014).

Devido à sinantropia exercida pela espécie, esses animais podem atuar ativamente na epidemiologia de doenças parasitárias de interesse para a saúde pública pois circulam entre o ambiente urbano e o rural (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento e Horta, 2014).

No ambiente urbano esses animais procuram por abrigo, água e alimento, e por apresentarem hábitos alimentares onívoros e oportunistas podem se infectar no momento da alimentação ao serem expostos a parasitas (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento e Horta, 2014). Ainda no ambiente urbano, comumente sofrem ataques de animais domésticos, principalmente de cães, especialmente as

fêmeas em épocas reprodutivas por estarem mais lentas devido à presença dos filhotes no marsúpio e/ou na região dorsal do corpo.

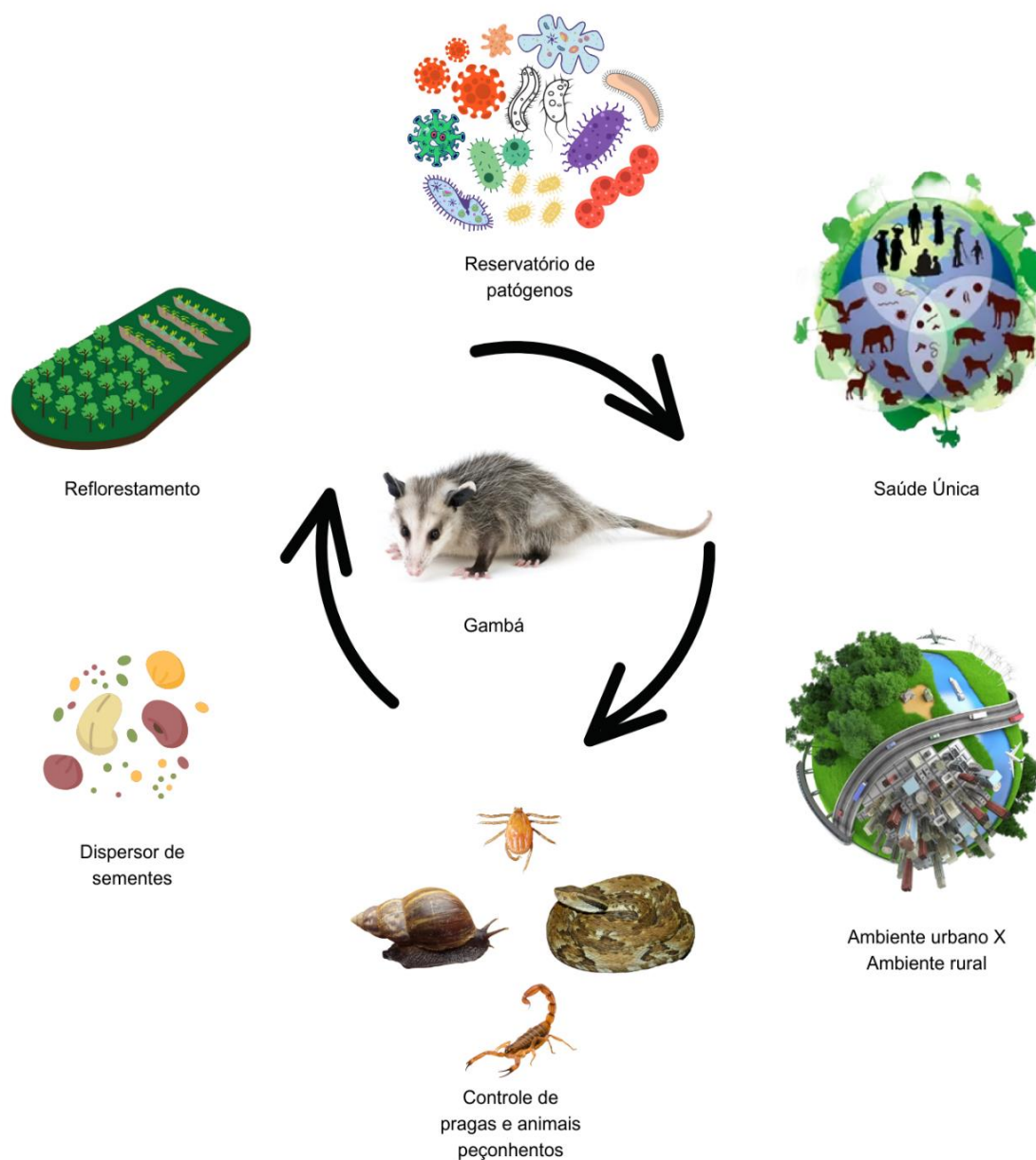
Pesquisas anteriores documentaram que esse grupo de mamíferos desempenha um papel crucial na transmissão de uma variedade de patógenos, tanto endoparasitas quanto ectoparasitas. Ayla *et al.*, (1973) sugeriram que talvez os marsupiais Didelphídeos sejam mais suscetíveis a infecções por hemoparasitas do que a maioria dos mamíferos eutérios.

Os ectoparasitas mais comumente encontrados nos gambás são insetos como piolhos e pulgas, e aracnídeos como ácaros e carrapatos (Nascimento e Horta, 2014). Em casos de parasitismo por piolhos e pulgas, o hospedeiro pode ter irritação de pele, prurido e, em casos de infestações mais graves, quadros de anemia (Nascimento e Horta, 2014). Os ácaros comumente causam sarna, que resulta em prurido intenso e irritação cutânea. Já os carrapatos causam prurido e irritação cutânea local (Nascimento e Horta, 2014).

Ectoparasitas possuem grande relevância médico-veterinária e para a saúde pública, pois, além de parasitarem os animais, podem veicular agentes patogênicos e, conseqüentemente, transmiti-los aos seres humanos (Nascimento e Horta, 2014). A babesiose, borreliose, dipetalonemose, dipilidiose, doença de Lyme-símile, febre maculosa, erliquiose, mixomatose, peste bubônica, salmonelose e tripanossomoses são exemplos de doenças causadas por patógenos transmitidos a gambás por ácaros, carrapatos, piolhos e pulgas (Nascimento e Horta, 2014).

Esses pequenos marsupiais são considerados potenciais reservatórios de diversos patógenos, tais como *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium*, hemogregarinas, artrópodes hematófagos, dentre outros, desempenhando, assim, papel importante na abordagem da Saúde Única (Ayla *et al.*, 1973; Nascimento e Horta, 2014; Roque *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2017; Jansen *et al.*, 2018; Zecca *et al.*, 2020).

Figura 4. Papel ecológico dos gambás.



Fontes das imagens: Canva / Google imagens / <https://www.gratispng.com>

Devido ao seu comportamento, biologia, abundância de espécimes e alto número de animais resgatados por centros de conservação e zoológicos, os gambás são considerados como modelos de estudos biológicos, ecológicos e evolutivos.

Estudos complementares acerca do papel do gambá na epidemiologia e transmissão de patógenos são necessários, além da educação ambiental da população sobre a importância ecológica que a espécie desempenha.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente estudo objetivou investigar a infecção de protozoários do gênero *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. e/ou bactérias do gênero *Ehrlichia* spp. em gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) de vida livre no Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as possíveis alterações clínicas e laboratoriais por meio de exame físico, hemograma completo e testes parasitológicos, nos hospedeiros analisados;
- Empregar análises moleculares na investigação de fragmentos de DNA de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e/ou *Ehrlichia* spp. em amostras sanguíneas de gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*);
- Realizar avaliação e comparação dos parâmetros hematológicos dos gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) com foco em contribuir com novos dados à literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÕES

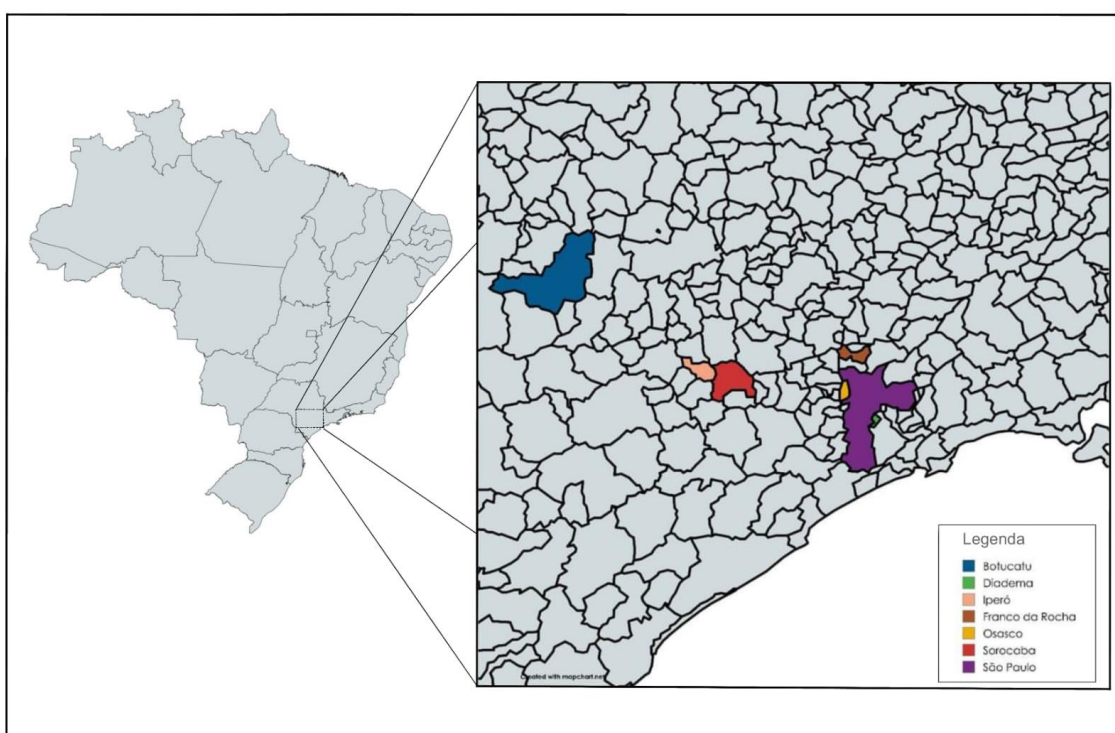
Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo 0237/2022 e obtiveram autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número 84319-1.

As coletas sanguíneas de parte das amostras foram realizadas em estudo prévio a este e obtiveram autorização do CEUA sob o protocolo 0055/2021 e do SISBIO sob número 78287-1, respeitando todas as normas éticas estabelecidas (Rodrigues, 2022).

4.2 LOCAIS DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido no Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" (PZMQB) em Sorocaba/SP, no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres (CeMaCAS), em São Paulo/SP, e na Vigilância Ambiental em Saúde (VAS), em Botucatu/SP. As amostras foram oriundas de sete municípios do Estado de São Paulo, sendo esses Botucatu, Diadema, Franco da Rocha, Iperó, Osasco, São Paulo e Sorocaba (figura 5).

Figura 5. Localização geográfica dos locais de coleta das amostras biológicas dos gambás inseridos no presente estudo.



Fonte: MapChart

4.2.1 Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" - PZMQB

O Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", ou Zoológico de Sorocaba, foi inaugurado em outubro de 1968 e desde 1993 é considerado cartão postal da cidade de Sorocaba. O Parque Zoológico possui uma área de 128.339 metros quadrados, fica situado entre os bairros Vila Hortência e Vila Haro, o lago ocupa uma área de aproximadamente 17.500 metros quadrados e há uma área de 38.700 de mata secundária que é abrigo de 1.200 animais em

180 espécies de mamíferos, aves e répteis (figura 6) (Prefeitura de Sorocaba, 2023).

Tem como objetivos o oferecimento de recreação e contato com a natureza através de visitação, programas de educação ambiental, colaboração em projetos de pesquisa que geram conhecimento sobre a Medicina da Conservação (comportamento, reprodução e fisiologia animal), atuando na conservação de fauna por meio de planos de manejo (*in situ* e *ex situ*). Dos animais mantidos sob cuidados humanos no Zoológico, cerca de 70% são pertencentes à fauna nacional. Devido às condições de infraestrutura (Programa de educação ambiental, laboratório, auditório, biblioteca...), é classificado pelo IBAMA na categoria A (Prefeitura de Sorocaba, 2023).

O período de coleta de amostras foi de novembro/2022 a março/2023 e foram obtidas um total de 32 amostras sanguíneas, sendo 29 amostras de *Didelphis albiventris* e três de *Didelphis aurita*.

Figura 6. Localização geográfica do PZMQB, no município de Sorocaba.



Fonte: Google Earth

4.2.2 Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres – CeMaCAS

A Divisão da Fauna Silvestre (DFS) foi criada em outubro de 1993 com o intuito de cuidar dos animais silvestres pertencentes aos parques municipais.

Atualmente possui duas unidades de atendimento e manejo no município de São Paulo, uma no Parque Anhanguera (CeMaCAS) (figura 7) e outra no Parque Ibirapuera (Prefeitura de São Paulo, 2023).

Desenvolve ações de conservação da fauna silvestre no município, realizando o recebimento e resgate de animais silvestres (órfãos, vitimados e oriundos de apreensão atuando no combate ao tráfico) pela Polícia Ambiental e pela entrega voluntária de munícipes. Possui atendimento médico veterinário com suporte laboratorial e atua na triagem, recuperação, reabilitação e destinação dos animais silvestres (Prefeitura de São Paulo, 2023).

O período de coleta de amostras deu-se de janeiro a maio de 2023 e foram obtidas um total de 21 amostras sanguíneas, sendo quatro amostras de *Didelphis albiventris* e 17 de *Didelphis aurita*.

Figura 7. Localização geográfica do CeMaCAS, no município de São Paulo.



Fonte: Google Earth

4.2.3 Vigilância Ambiental em Saúde (VAS)

A Vigilância Ambiental em Saúde é uma divisão da Secretaria Municipal de Saúde de Botucatu (figura 8). Atua no resgate de animais silvestres no município, realiza o monitoramento e controle de zoonoses, controle de animais

sinantrópicos, dentre outras ações interligadas à saúde pública (Prefeitura de Botucatu, 2023).

As coleta das amostras foram realizadas no período de julho a novembro de 2021, em projeto anterior a esse (Rodrigues, 2022) sendo obtidas um total de 62 amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris*.

Figura 8. Localização geográfica do VAS, no município de Botucatu.



Fonte: Google Earth

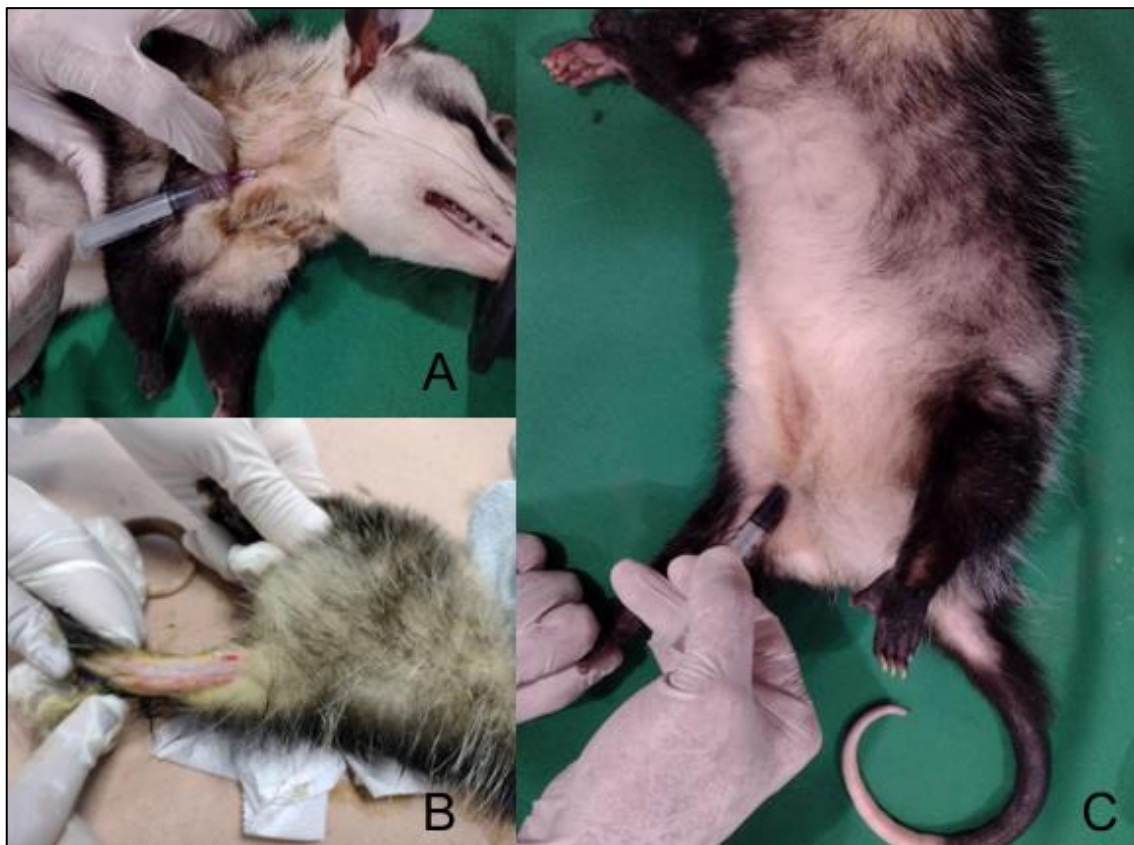
4.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL

Durante os exames de rotina e/ou admissão dos animais nas instituições, foi realizada contenção física de cada indivíduo, com uso de equipamentos de segurança (luva de raspa), por profissionais capacitados para tal procedimento. As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção das veias jugular, femoral ou coccígea lateral, a depender da experiência do manipulador, conforme mostra figura 9. Foram coletados em média 1,5 mL de sangue total utilizando-se agulhas 24G e/ou 22G e seringas de 3 mL.

O material obtido foi armazenado de duas formas: 0,5 mL do sangue total foi acondicionado em microtubo contendo EDTA para posterior realização de hemograma completo e papa de leucócitos e, 1 mL de sangue foi acondicionado

em microtubo de plástico Eppendorf contendo EDTA e congelado a -20°C até a extração do DNA.

Figura 9. Coleta sanguínea em *Didelphis albiventris*.



Coleta sanguínea em exemplar de *Didelphis Albiventris*, fêmea adulta. A: veia jugular direita. B: veia coccígea lateral esquerda. C: veia femoral direita. Animais A e C sob contenção química e animal B sob contenção física.

Fonte imagem A e C: Arquivo pessoal;

Fonte imagem B: Rodrigues, L.P., 2022.

Durante a avaliação física dos gambás, observou-se que poucos animais estavam infestados por ectoparasitas, o que pode estar relacionado ao seu hábito alimentar, visto que esses marsupiais se alimentam também de pulgas e carrapatos (Nascimento e Horta, 2014).

4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os hemogramas e as lâminas de esfregaços sanguíneos das amostras dos animais oriundos do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” foram realizados no Laboratório da Clínica Veterinária Cão Boy, Sorocaba, SP.

Enquanto isso, os hemogramas e esfregaços sanguíneos das amostras provenientes dos animais do Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres foram realizados no Laboratório de Estudos da Fauna Silvestre, São Paulo, SP (figura 10).

Esses métodos diagnósticos foram realizados nas amostras dos animais provenientes do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” e do Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres – CeMaCAS pois o material disponível era sangue fresco, diferentemente das amostras provenientes da Vigilância Ambiental em Saúde – VAS, que se tratava de DNA genômico congelado.

4.4.1 Hemograma

Foram realizados hemogramas completos dos 32 animais do PZMQB e 19 do CeMaCAS, logo após a coleta sanguínea, totalizando 51 amostras, utilizando sangue total fresco. Devido ao baixo volume sanguíneo, não foi possível realizar hemogramas completos de dois animais do CeMaCAS. No caso dos 62 animais provenientes do VAS Botucatu, o congelamento prévio das amostras impediu a realização dos hemogramas. Portanto, foi possível realizar hemogramas de 51 dos 115 animais (44,35%).

A realização dos hemogramas completos permitiu a avaliação das principais linhagens celulares (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) de cada animal. Os hemogramas foram realizados e interpretados por patologistas clínicas especializadas em Patologia Clínica de Animais Silvestres, por meio de parceria estabelecida para a execução deste projeto.

4.4.2 Avaliação morfológica

Da amostra obtida para realização do hemograma (0,5 mL de sangue), um capilar sanguíneo foi preenchido e levado à centrífuga para separação dos componentes sanguíneos (plasma, plaquetas + glóbulos brancos e glóbulos vermelhos) e com a papa leucocitária foram confeccionadas de uma a duas extensões sanguíneas por amostra, totalizando 77 lâminas.

Para a confecção das lâminas, foi utilizada a técnica de cunha, também conhecida como método de deslizamento. Logo após a secagem, as lâminas foram coradas com kit comercial Panótico rápido, segundo as instruções do

fabricante e, posteriormente, cada lâmina foi analisada individualmente em microscópio óptico. A pesquisa pelos parasitas intracelulares ocorreu por meio da observação de alta magnificação (objetiva de 100x) em óleo de imersão.

Figura 10. Fluxograma das análises laboratoriais realizadas no estudo.



Fontes das imagens: Google imagens / <https://www.gratispng.com>

4.5 ANÁLISES MOLECULARES

As extrações de DNA e a quantificação do material extraído de todas as amostras sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, SP. Enquanto isso, as Reações em Cadeia da Polimerase,

purificação e o sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Carrapatos e outros Artrópodes Ápteros do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ (figura 11).

4.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA das 115 amostras obtidas foi realizada pela técnica de fenol/clorofórmio, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) com modificações (anexo 1). Para a quantificação do DNA extraído, foi utilizado o espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Termo Fisher Scientific*), por meio de absorbância a 260-280nm.

A qualidade do material foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de agarose à 1,5%, corado com Gel Red (Uniscience) (0,1µL/10 mL), imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético – EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens sob luz ultravioleta.

4.5.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a investigação da presença de fragmentos de DNA de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. nas amostras de sangue dos animais estudados, foram realizadas PCRs, convencional e *Nested-PCR*, em termociclador AmpliGene Lite (Loccus). Os conjuntos de *primers* utilizados neste trabalho, bem como as principais informações e referências estão listados na tabela 3.

Babesia spp.

As análises de PCR foram realizadas com os pares de *primers* denominados BAB143-167 *forward* e BAB858-834 *reverse* que amplificam um fragmento de aproximadamente 715pb de *Babesia* spp. do gene 18S rRNA (Lemos *et al.*, 2012).

As reações de PCR foram realizadas com um volume total final de 25µL, contendo 2,5 µL Buffer 10X desprovido de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 0,75 µL de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 0,5 µL dNTP (Cellco Biotech, São Paulo, Brasil), 0,5 µL de cada *primer*, 0,2 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 2,0 µL de DNA genômico e

18,05 uL de água ultrapura livre de DNase e RNase. Controle positivo (DNA de *Babesia vogeli*) e controle negativo (água ultrapura livre de DNase e RNase) foram utilizadas em cada reação.

Os ciclos de temperatura da PCR seguiram o protocolo citado por Lemos *et al.*, (2012) e consistiu em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, 40 ciclos repetitivos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 64°C, 1 minuto a 72°C, seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Hepatozoon spp.

As análises de PCR foram realizadas com os pares de *primers* denominados Hep144-169 *forward* e Hep743-718 *reverse*, que amplificam um fragmento de aproximadamente 574pb de *Hepatozoon* spp. do gene 18S rRNA (Almeida, 2012).

As reações de PCR foram realizadas com um volume total final de 25uL, contendo 2,5 uL Buffer 10X desprovido de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 0,75 uL de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 0,5 uL dNTP (Cellco Biotech, São Paulo, Brasil), 0,5 uL de cada *primer*, 0,2 uL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 2,0 uL de DNA genômico e 18,05 uL de água ultrapura livre de DNase e RNase. Controle positivo (DNA de *Hepatozoon* spp.) e controle negativo (água ultrapura livre de DNase e RNase) foram utilizadas em cada reação.

Os ciclos de temperatura da PCR seguiram o protocolo citado por Almeida (2012) e consistiu em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguidos de uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Ehrlichia spp.

Para pesquisa de *Ehrlichia* spp. foi realizada uma primeira reação de PCR com os pares de *primers* denominados DSB-330 *forward* e DSB-720 *reverse* que amplificam um fragmento de 401pb e 349pb, respectivamente, do gene *dsb*, conforme descrito por Doyle *et al.*, (2005) e Almeida (2012). Com os pares de *primers* denominados DSB-380 *senso* e DSB-720 *anti-senso*, que amplificam um fragmento de 349pb do gene *dsb*, foi realizada a técnica de *Nested-PCR* (Almeida, 2012).

As reações de PCR foram realizadas com um volume total final de 25uL, contendo 2,5 uL Buffer 10X desprovido de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts,

EUA), 0,75 uL de MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 0,5 uL dNTP (Cellco Biotech, São Paulo, Brasil), 0,2 uL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Massachusetts, EUA), e 18,05 uL de água ultrapura livre de DNase e RNase. A primeira reação de PCR contou ainda com 0,5 uL do *primer* DSB-330 senso, 0,5 uL do *primer* DSB-720 anti senso e 2,0 uL de DNA genômico, e a segunda reação (*Nested-PCR*) contou com 0,5 uL do *primer* DSB-380, 0,5 uL do *primer* DSB-720 e 2uL do *amplicon* da primeira reação. Controle positivo (DNA de *Ehrlichia* spp.) e controle negativo (água ultrapura livre de DNase e RNase) foram utilizadas em cada reação.

Os ciclos de temperatura seguiram o protocolo citado por Almeida (2012) e na primeira reação de PCR consistiu em uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 30 segundos a 72°C, seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Na *Nested-PCR* a desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, 30 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C, seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e/ou *Ehrlichia* spp.

Agente	Região genética	Gene alvo e pares de primers	Sequência dos primers 5' – 3'	Fragmento amplificado (pb)	Referência bibliográfica
<i>Babesia</i> spp.	143-167 858-834	18S rRNA			
		BAB143-167	F - CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	715 pb	Lemos <i>et al.</i> , 2012
		BAB858-834	R – CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCC		
<i>Hepatozoon</i> spp.	144-169 743-718	18S rRNA			
		HEP-F	F - GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574 pb	Almeida, 2012
		HEP-R	R – ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG		
<i>Ehrlichia</i> spp.		Dsb			
		DSB-330	F - GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401 pb	Doyle <i>et al.</i> , 2005
		DSB-380 DSB-720	F - ATTTTATAGRGATTTTCCAATACTTGG R – CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC	349 pb	Almeida, 2012

Fonte: Própria autora

4.5.3 Eletroforese horizontal em gel de agarose

Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, os produtos (*amplicons*) da PCR e da *Nested-PCR* foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose a 2%, imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético – EDTA) corrido em cuba horizontal (Loccus LCH-13x15) a 90V por 50 minutos e após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo.

Os géis foram visualizados em transiluminador (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, Reino Unido) com o software UVP® VisionWorksLS™ (LifeScience Software) comparados a um padrão de peso molecular de um 1 Kb Plus (Uniscience). As amostras que revelaram bandas na altura dos controles positivos foram consideradas positivas.

4.5.4 Purificação

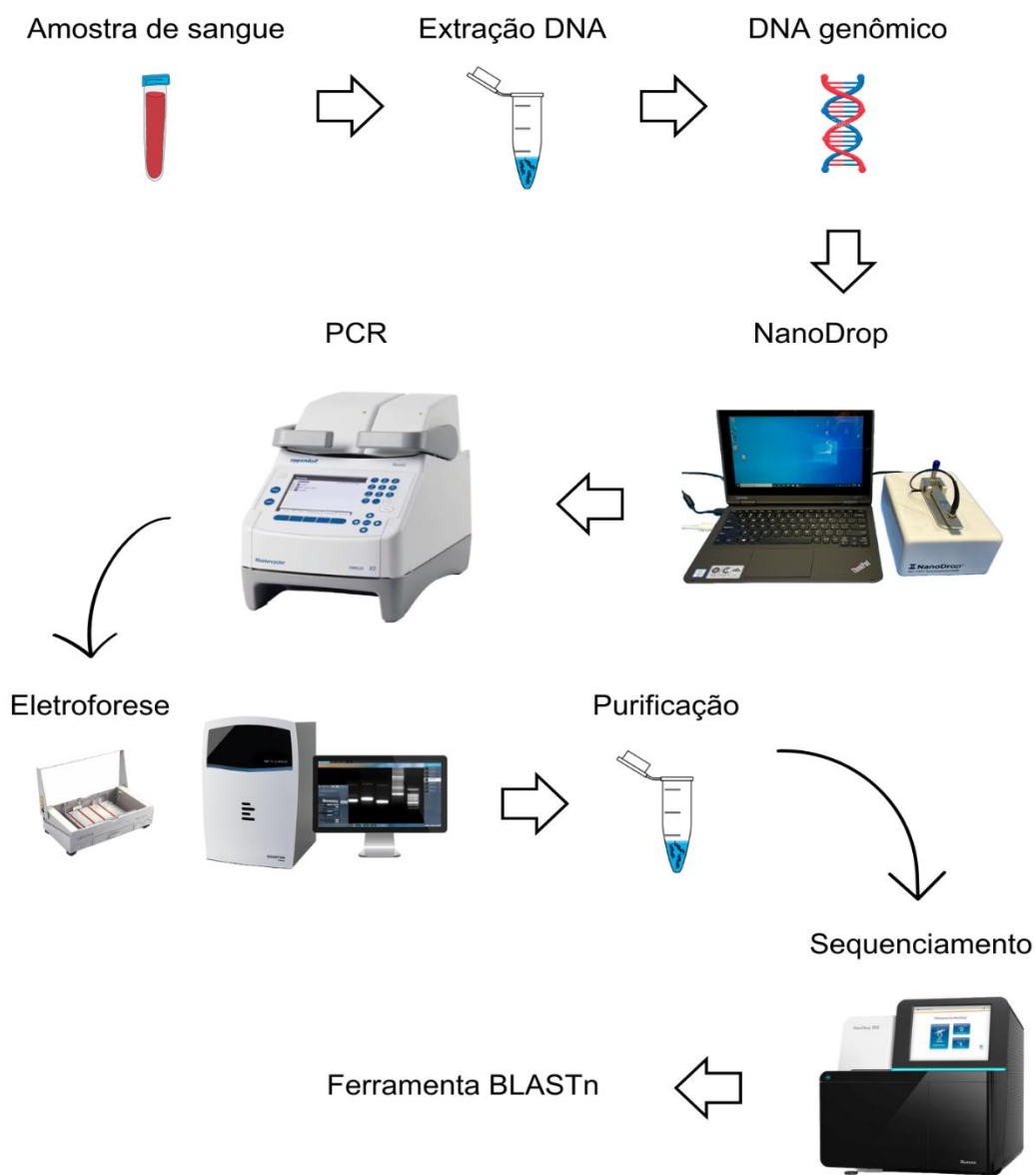
Os produtos da PCR que apresentaram o tamanho de banda esperado foram purificados utilizando o kit comercial ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega, Madison, EUA), segundo as orientações do fabricante e submetidos à reação de sequenciamento.

4.5.5 Sequenciamento genético

O DNA foi sequenciado em ambas as direções, aplicando os mesmos iniciadores da PCR e o Big Dye Terminator™ Cycle Sequencing Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As sequências nucleotídicas foram lidas por um sequenciador automático ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

As sequências obtidas foram editadas com o *software* Chromas Pro, versão 1.5 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Austrália) e submetidas a identificação de similaridade com sequências conhecidas utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) para verificar a homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank (Altschul *et al.*, 1990).

Figura 11. Fluxograma das análises moleculares realizadas no estudo.



Fontes das imagens: Canva / Google imagens / <https://www.gratispng.com>

5 RESULTADOS

Foram obtidas 115 amostras dos três locais de coleta, sendo 95 da espécie *D. albiventris* e 20 *D. aurita*, e as informações encontram-se descritas na tabela 4. O grupo era composto por 33/115 (28,70%) machos, 58/115 (50,43%) fêmeas e 24/115 (20,87%) animais com sexo indeterminado. Dentre estes, 16/115 (13,91%) eram filhotes, 16/115 (13,91%) jovens e 83/115 (72,18%) adultos, conforme mostra tabela 5.

Tabela 4. Informações relativas às espécies dos gambás inseridos no estudo.

ESPÉCIE	NOME POPULAR	PZMQB Sorocaba	CeMaCAS SP	VAS Botucatu	Total por espécie
<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelha-branca	29	4	62	95
<i>Didelphis aurita</i>	Gambá-de-orelha-preta	3	17	0	20
Total de animais por localidade		32	21	62	115

Fonte: Própria autora

Tabela 5. Informações relativas ao sexo e à faixa etária dos gambás inseridos no estudo.

SEXO E FAIXA ETÁRIA DOS ANIMAIS			
		Nº	%
SEXO	Fêmeas	58	50,43
	Machos	33	28,70
	Indeterminado	24	20,87
FAIXA ETÁRIA	Filhotes	16	13,91
	Jovens	16	13,91
	Adultos	83	72,18

Fonte: Própria autora

5.1 ECTOPARASITAS

Dos animais oriundos do PZMQB, seis gambás apresentaram infestação por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, dois gambás por carrapatos *Amblyomma longirostre* e um animal por larvas L2 de *Cochliomyia hominivorax*.

Do CeMaCAS havia dois gambás parasitados por pulgas, um por carrapatos e um por ácaro. Não foi realizada a identificação morfológica desses ectoparasitas.

Do VAS, seis gambás apresentaram infestação por pulgas e dois estavam parasitados por carrapatos. Não foi realizada a identificação morfológica desses ectoparasitas.

Não foram realizadas análises moleculares nos ectoparasitas coletados.

5.2 HEMOGRAMA

Dentre os 51 animais examinados, 32 pertenciam à espécie *D. albiventris* e 19 à espécie *D. aurita*. Entre os animais de *D. albiventris*, 16 eram fêmeas, nove machos e sete tinham o sexo indeterminado, além disso, sete eram jovens e 25 adultos. Por sua vez, dentre os animais de *D. aurita*, havia três fêmeas, um macho e 15 animais com sexo indeterminado, e em relação à faixa etária, três eram jovens e 16 adultos. Os pesos dos animais variaram entre 0,460kg e 2,8kg.

Os resultados dos parâmetros hematológicos de *D. albiventris* e *D. aurita* obtidos no presente estudo encontram-se listados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Valores mínimos, máximos, média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de *Didelphis albiventris* do Estado de São Paulo.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS				
	Mínimo	<i>Didelphis albiventris</i>		Referência*
		Máximo	Média (desvio-padrão)	Média
Hemácias (x10 ⁶ /uL)	2,14	5,3	3,72 (± 0,74)	4,16
Hemoglobina (g/dL)	4,9	12,3	9,0 (± 2,08)	10,3
Hematócrito (%)	17	45	30,33 (± 5,96)	34,35
VCM (fL)	62,2	117,11	84,12 (± 11,16)	90,25
HCM (pg)	14,4	31,7	24,90 (± 3,60)	28
CHCM (%)	22,68	44,4	29,77 (± 4,23)	33,9
Eritroblastos /100 Leu	0	14	0,90 (± 3,44)	-
Leucócitos totais (/uL)	2100	24 900	12 269,12 (± 4795,64)	9 480
Neutrófilos Bastonetes (x10 ⁶ /uL)	0	7	0,28 (± 1,25)	4,6
Neutrófilos Segmentados (x10 ⁶ /uL)	18	69	46,53 (± 11,95)	47,44
Linfócitos (x10 ⁶ /uL)	25	78	46,75 (± 11,45)	41,56
Eosinófilos (x10 ⁶ /uL)	0	15	3,74 (± 3,72)	3,5
Monócitos (x10 ⁶ /uL)	0	4	2,25 (± 1,24)	3,2
Basófilos (x10 ⁶ /uL)	0	0	0 (± 0)	1
Plaquetas (/uL)	26 600	1 292,000	230 245,16 (± 228084,83)	-
Proteína Plasmática Total (g/dL)	7,2	8,2	7,8 (± 0,58)	5,6

*Valores de referência: Tratado de animais selvagens, 2014.

Fonte: Própria autora

Tabela 7. Valores mínimos, máximos, média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de *Didelphis aurita* do Estado de São Paulo.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS				
	Mínimo	<i>Didelphis aurita</i>		Referência*
		Máximo	Média (desvio-padrão)	Média
Hemácias (x10 ⁶ /uL)	0,67	6,42	4,05 (± 1,41)	5,40
Hemoglobina (g/dL)	1,8	16,9	10,86 (± 3,57)	12,78
Hematócrito (%)	6	52	36,08 (± 9,94)	38,66
VCM (fL)	63,36	130,58	93,08 (± 19,34)	71,69
HCM (pg)	16,27	36,02	27,87 (± 7,08)	-
CHCM (%)	23,26	38,41	30,05 (± 5,08)	33,01
Eritroblastos /100 Leu	0	8	0,72 (± 1,96)	-
Leucócitos totais (/uL)	2415	29 190	11 342,21 (± 6835,45)	19 678,52
Neutrófilos Bastonetes (x10 ⁶ /uL)	0	0	0 (± 0)	0,77
Neutrófilos Segmentados (x10 ⁶ /uL)	20	88	55,78 (± 15,56)	41,12
Linfócitos (x10 ⁶ /uL)	1	50	24,05 (± 12,63)	41,97
Eosinófilos (x10 ⁶ /uL)	1	32	12,84 (± 8,97)	13,79
Monócitos (x10 ⁶ /uL)	0	10	2,78 (± 2,30)	1,75
Basófilos (x10 ⁶ /uL)	0	5	0,84 (± 1,26)	0,59
Plaquetas (/uL)	22 000	1 720,000	485 470,58 (± 422004,76)	514,70
Proteína Plasmática Total (g/dL)	5,4	8,2	6,9 (± 0,86)	7,95

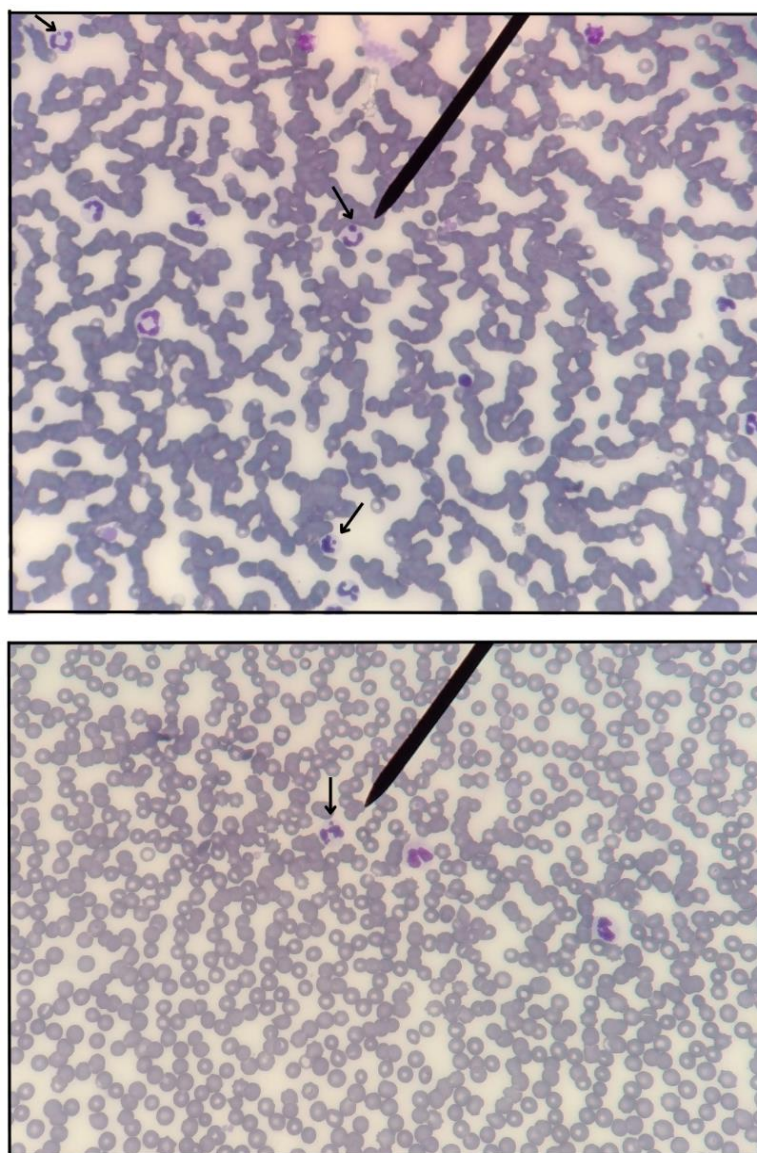
*Valores de referência: Moreira, 2013.

Fonte: Própria autora

5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

Na avaliação das lâminas de esfregaço sanguíneo foi observada a presença de inclusões em neutrófilos compatíveis com mórulas, sugestivas para *Ehrlichia* spp. em um animal 1/77 (1,29%), conforme pode-se observar na figura 12. Tal achado sugere a possibilidade de infecção por *Ehrlichia* spp. (Aguiar, 2015; Bouza-Mora *et al.*, 2016; Taques, 2020; Armando, 2022; Macedo e Lima, 2023).

Figura 12. Inclusões em leucócitos (setas) sugestivas de *Ehrlichia* spp.



Imagens demonstrando mórulas sugestivas de *Ehrlichia* spp. em leucócitos de Gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) parasitado por ovos e larvas L2 de mosca (*Cochliomyia hominivorax*), provenientes do PZMQB. Aumento de 40x.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nenhuma das 77 lâminas de esfregaços sanguíneos foi positiva para *Babesia* spp. e/ou *Hepatozoon* spp. (tabela 8). Em uma das lâminas foi observada a presença de inclusões intraplaquetárias, sugestivas de *Anaplasma* spp., em 1/77 (1,29%), porém, essa amostra não foi avaliada molecularmente (Ramos, 2009; Cavalcante, 2021; Lopes et al., 2022).

Tabela 8. Esfregaço sanguíneo das amostras dos gambás examinados.

ESPÉCIE	ECTOPARASITAS	ORIGEM	ESFREGAÇO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Pulgas	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Pulgas	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Pulgas	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Pulgas	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Carrapatos	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Ovos de mosca e larvas	PZMQB	MÓRULAS
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	PZMQB	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Pulgas	CeMaCAS	NEGATIVO

<i>D. aurita</i>	Carrapatos	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. albiventris</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Ácaro (sarna)	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Pulgas	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO
<i>D. aurita</i>	Não	CeMaCAS	NEGATIVO

*Negativos para os patógenos investigados no presente estudo.

Fonte: Própria autora

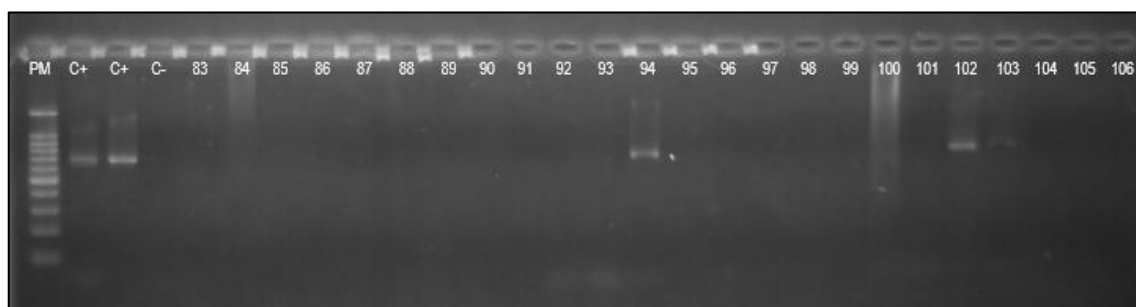
5.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As amostras apresentaram concentração de DNA superiores a 6,1ng/uL, valores suficientes para as análises propostas neste estudo.

***Babesia* spp.**

Das 115 amostras testadas na PCR convencional para protozoários do gênero *Babesia* spp. (18S), cinco foram positivas (94, 102, 103, 109 e 114), sendo quatro animais do sexo feminino (80%) e um masculino (20%), conforme mostram as figuras 13 e 14 e a tabela 9. Todas as amostras eram provenientes do município de Botucatu, SP. A prevalência de infecção por *Babesia* spp. foi de 4,34%. Todas as amostras positivas foram sequenciadas e submetidas ao BLASTn – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico.

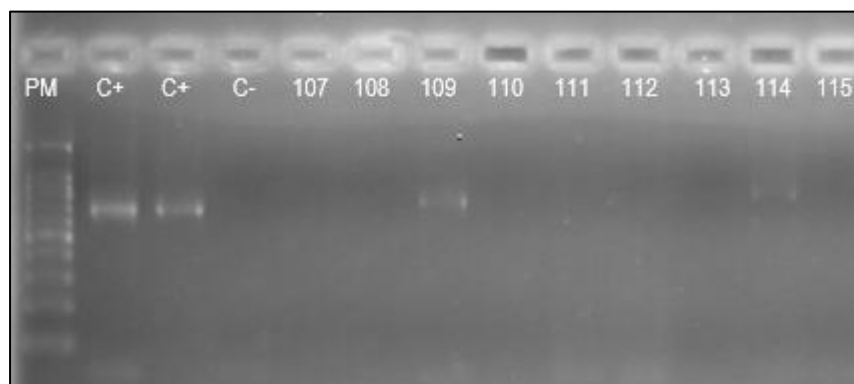
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose da PCR para *Babesia* spp.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, da PCR para um fragmento do gene 18S rRNA, de amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris*. Coluna 1: padrão de peso molecular 1 Kb Plus (Uniscience); Colunas 2 e 3: controles positivos *Babesia vogeli*; Coluna 4: controle negativo; Colunas 5-28: amostras 83-106 dos espécimes em estudo. As amostras 95, 102 e 103 foram consideradas positivas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose da PCR para *Babesia* spp.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, da PCR para um fragmento do gene 18S rRNA, de amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris*. Coluna 1: padrão de peso molecular 1 Kb Plus (Uniscience); Colunas 2 e 3: controles positivos *Babesia vogeli*; Coluna 4: controle negativo; Colunas 5-13: amostras 107-115 dos espécimes em estudo. As amostras 109 e 114 foram consideradas positivas.

Fonte: Arquivo pessoal.

***Hepatozoon* spp.**

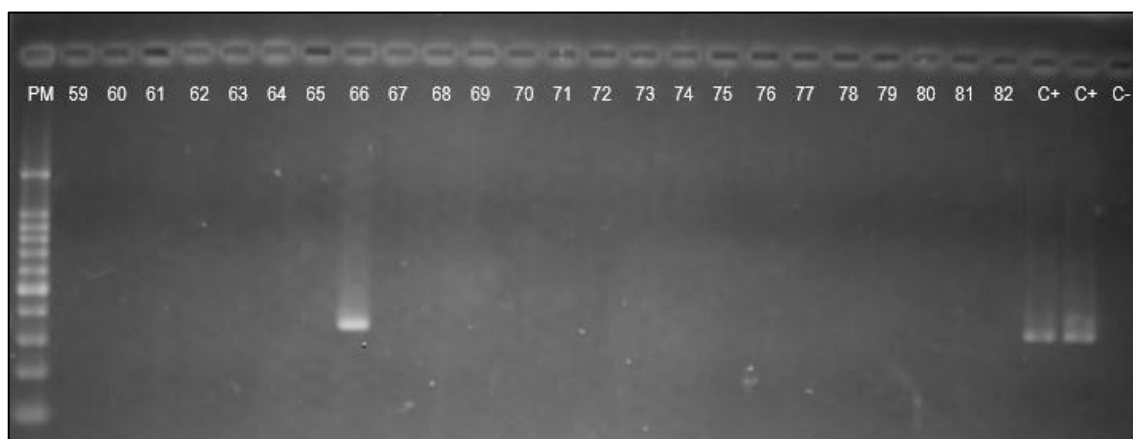
Todas as amostras sanguíneas dos gambás foram negativas na PCR para a detecção de protozoários do gênero *Hepatozoon* spp. (gene 18S rRNA).

***Ehrlichia* spp.**

Para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp., duas amostras (66 e 11) foram positivas e pertenciam a dois animais do sexo feminino (100%), conforme

mostram as figuras 15 e 16 e a tabela 9. Todas as amostras eram provenientes do município de Botucatu, SP. A prevalência de infecção por *Ehrlichia* spp. foi de 1,73%. Todas as amostras positivas foram sequenciadas e submetidas ao BLASTn – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico.

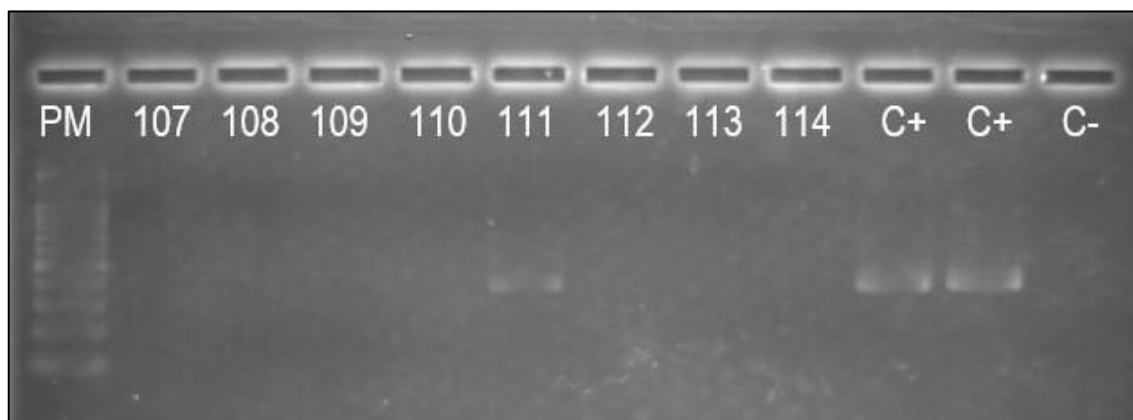
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose da PCR para *Ehrlichia* spp.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, da PCR para um fragmento do gene *dsb*, de amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris*. Coluna 1: padrão de peso molecular 1 Kb Plus (Uniscience); Colunas 2-25: amostras 59-82 dos espécimes em estudo; Coluna 26 e 27: controles positivos *Ehrlichia* spp.; Coluna 28: controle negativo. A amostra 66 foi considerada positiva.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose da PCR para *Ehrlichia* spp.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, da PCR para um fragmento do gene *dsb*, de amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris*. Coluna 1: padrão de peso molecular 1 Kb Plus (Uniscience); Colunas 2-9: amostras 107-114 dos espécimes em estudo; Colunas 10 e 11: controles positivos de *Ehrlichia* spp.; Coluna 12: controle negativo. A amostra 111 foi considerada positiva.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 9. Dados das amostras positivas do presente estudo.

ID amostra	HOSPEDEIRO	ORIGEM	PATÓGENO	MÉTODO DIAGNÓSTICO
28	<i>D. aurita</i>	PZMQB	<i>Ehrlichia</i> -like	Microscópico
94	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Babesia</i> spp.	Molecular
102	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Babesia</i> spp.	Molecular
103	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Babesia</i> spp.	Molecular
109	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Babesia</i> spp.	Molecular
114	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Babesia</i> spp.	Molecular
66	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Ehrlichia</i> spp.	Molecular
111	<i>D. albiventris</i>	VAS	<i>Ehrlichia</i> spp.	Molecular

Fonte: Própria autora

5.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

As amostras amplificadas foram sequenciadas e submetidas a análises BLASTn para avaliação da similaridade de sequências no banco de dados NCBI GenBank (Altschul *et al.*, 1990).

As sequências de nucleotídeos das cinco amostras positivas para *Babesia* spp. foram alinhadas com outras disponíveis no GenBank e os resultados indicaram uma identidade de 100% com o isolado *Babesia* sp. GP1 (MW290046) (Gonçalves *et al.*, 2021), conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Resultados do BLASTn para o gene *Babesia*.

Amostra	Identidade	GenBank	Referência	Localidade
BAB 94	100,00% (717/717)	<i>Babesia</i> sp. Isolado GP1 (MW290046)	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021	Brasília
BAB 102	100,00% (717/717)	<i>Babesia</i> sp. Isolado GP1 (MW290046)	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021	Brasília
BAB 103	100,00% (717/717)	<i>Babesia</i> sp. Isolado GP1 (MW290046)	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021	Brasília
BAB 109	100,00% (717/717)	<i>Babesia</i> sp. Isolado GP1 (MW290046)	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021	Brasília
BAB 114	100,00% (717/717)	<i>Babesia</i> sp. Isolado GP1 (MW290046)	Gonçalves <i>et al.</i> , 2021	Brasília

Fonte: Stephany Rocha Ribeiro

As sequências de nucleotídeos das duas amostras positivas para *Ehrlichia* spp. também foram alinhadas com outras disponíveis no GenBank. Os resultados para a amostra 66 indicaram uma identidade de 100% com o Uncultured *Ehrlichia* sp. clone GNa (KY207546) (Lopes *et al.*, 2018) e com *Ehrlichia* sp. isolate DA5.1 (OP270482) (Tarragona *et al.*, 2022) (tabela 11). Já,

a amostra 111, apresentou 99,71% de identidade com *Ehrlichia* sp. isolate DA5.1 (OP270482) (Tarragona *et al.*, 2022), conforme observado na tabela 11.

Tabela 11. Resultados do BLASTn para o gene *Ehrlichia*.

Amostra	Identidade	GenBank	Referência	Localidade
ER 66	100,00% (325/325)	Uncultured <i>Ehrlichia</i> sp. clone GNa (KY207546)	Lopes <i>et al.</i> , 2018	Natal, Rio Grande do Norte
		<i>Ehrlichia</i> sp. isolate DA5.1 (OP270482)	Tarragona <i>et al.</i> , 2022	Província Formosa, Argentina
ER 111	99,71% (349/350)	<i>Ehrlichia</i> sp. isolate DA5.1 (OP270482)	Tarragona <i>et al.</i> , 2022	Província Formosa, Argentina

Fonte: Stephany Rocha Ribeiro

6 DISCUSSÃO

Na avaliação dos parâmetros hematológicos de *D. albiventris*, Casagrande *et al.*, (2009) relataram valores menores de hemácias, hematócrito e leucócitos, porém valores semelhantes de hemoglobina e proteína plasmática total (PPT). Segundo o estudo de Carneiro *et al.*, (2010), há semelhanças nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito, porém os autores relataram níveis menores de PPT e maior contagem de leucócitos. Em contraste, de acordo com Tarragona *et al.*, (2011), os valores para os mesmos parâmetros são maiores do que os descritos aqui neste trabalho. Segundo o encontrado no Tratado de Animais Selvagens (Nascimento e Horta, 2014), os valores são semelhantes para hemácias, hemoglobina, hematócrito e leucócitos, porém os valores de PPT são menores que os do presente trabalho.

Nos estudos com *D. aurita*, Casagrande *et al.*, (2009) relataram valores menores para hemácias, hemoglobina, hematócrito e leucócitos, porém observaram níveis mais altos de PPT. De acordo com Moreira (2013), os valores de hemácias e hematócrito são semelhantes aos aqui descritos, mas os níveis de hemoglobina e leucócitos são maiores. Enquanto Teixeira (2021), descreveu valores menores de hematócrito e PPT, porém apresentou resultados semelhantes de hemácias, hemoglobina e leucócitos.

As divergências entre os valores dos estudos podem refletir diferenças nas metodologias aplicadas, variações geográficas, fatores biológicos intrínsecos à espécie e/ou técnicas laboratoriais utilizadas.

No presente trabalho optou-se utilizar como referência os valores hematológicos descritos para *Didelphis albiventris* no Tratado de animais selvagens (Nascimento e Horta, 2014), enquanto para *Didelphis aurita* os valores foram baseados nos resultados relatados por Moreira (2013). Essas escolhas foram fundamentadas na confiabilidade dos estudos selecionados. Foram elencados dois trabalhos como referência pois não encontramos estudos recentes na literatura que informassem os valores hematológicos para ambas as espécies, desta forma, utilizou-se uma referência para cada espécie.

Não houve positividade em nenhuma das lâminas de esfregaço sanguíneo para os protozoários estudados (*Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp.), no entanto, esses resultados podem corroborar com o que foi mencionado por outros autores, que descreveram a babesiose e a hepatozoonose como doenças com caráter crônico e parasitemia intermitente (Baneth *et al.*, 1998; O'Dwyer *et al.*, 2001; Brandão e Hagiwara, 2002; Silva *et al.*, 2011; Braga e Silva, 2013; Soares, 2015; Dias e Ferreira, 2016; Perles, 2019; Pereira *et al.*, 2021; Bittencourt *et al.*, 2022). Essa condição pode dificultar o diagnóstico por meio de testes parasitológicos devido à baixa parasitemia, o que pode explicar a ausência de detecção dos parasitas nas lâminas de esfregaço sanguíneo.

Embora tenham sido observadas mórulas compatíveis com *Ehrlichia* spp. em esfregaço sanguíneo de uma amostra, não houve detecção molecular por PCR dessa amostra em questão. Com base na interpretação do hemograma do animal, os resultados sugerem anemia macrocítica hipocrômica, trombocitopenia, desidratação e possíveis sinais de um processo inflamatório e/ou infeccioso. Mesmo que a anemia mais comumente identificada na erliquiose seja anemia regenerativa, essas alterações laboratoriais encontradas são compatíveis com o observado em infecções por *Ehrlichia* spp. (Aguiar, 2015; Armando, 2022).

A detecção de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. foi relatada em outros estudos realizados com gambás no Brasil, como pode ser observado na tabela 1 (Melo *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Souza *et al.*,

2017; Lopes *et al.*, 2018; Colle *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.* 2021; André *et al.*, 2022; Weck, 2022).

Melo *et al.*, (2016) relataram o diagnóstico sorológico de *Ehrlichia canis* em *D. albiventris* e *D. aurita* nos municípios de Biritiba-Mirim, Salesópolis, São Bernardo do Campo, São Paulo e Sorocaba, no Estado de São Paulo. Porém, no presente trabalho, optou-se pelas avaliações parasitológica e molecular, não incluindo a avaliação sorológica.

De acordo com o estudo de Silva *et al.*, (2017), das 19 amostras analisadas de gambás de orelha branca (*D. albiventris*) da região de Botucatu, SP, uma apresentou resultado positivo para a presença de *Hepatozoon* spp. tanto no esfregaço sanguíneo quanto na PCR, enquanto outra amostra foi positiva apenas na PCR. Porém, em nosso estudo, onde pesquisamos o mesmo patógeno, no mesmo hospedeiro e na mesma região, não houve detecção molecular.

Em um estudo conduzido por Soares *et al.*, (2017) na região da Amazônia brasileira, foi detectado molecularmente a presença de *Babesia* spp. em *D. marsupialis*. No entanto, a pesquisa não detectou a presença de *Hepatozoon* spp.

Segundo o estudo de Souza *et al.*, (2017), que analisou roedores, marsupiais e carnívoros no Pantanal, *Hepatozoon* spp. foi detectado morfolologicamente em *D. albiventris*. Em outra pesquisa envolvendo roedores e marsupiais na Amazônia brasileira, *D. marsupialis* apresentou resultado positivo para detecção de *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. (Colle *et al.*, 2019).

De acordo com Guimarães *et al.*, (2019) em estudo realizado no Rio de Janeiro houve a detecção molecular de "um novo genótipo de *Ehrlichia* sp. intimamente relacionado a genótipos de *E. canis* previamente relatados em cães no Brasil", em *Didelphis aurita*.

Em estudo realizado por André *et al.* (2022), amostras sanguíneas e carrapatos coletados de 43 gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) de fragmentos florestais urbanos do centro-oeste do Brasil foram avaliadas por meio de técnicas morfológicas e moleculares com o objetivo de investigar a presença de *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp e *Hepatozoon* spp. Como resultado, os autores descreveram a ocorrência de "supostos novos genótipos de *Ehrlichia* sp. e

Hepatozoon sp. em gambás-de-orelha-branca e carrapatos *Amblyomma dubitatum* associados do centro-oeste do Brasil".

Weck (2022) relatou que em um estudo realizado com roedores e marsupiais do Cerrado e na Mata Atlântica, foi detectado molecularmente a presença de *Hepatozoon* spp. em um indivíduo da espécie *D. aurita* do Mato Grosso do Sul e não foi detectada a presença de *Babesia* spp. nem *Ehrlichia* spp.

Achados anteriores sobre a ocorrência de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. relataram a detecção dos patógenos em outros hospedeiros (canídeos, roedores silvestres e gambás) especificamente na região do Estado de São Paulo, o que confirma a presença dos patógenos nessa região geográfica (O'Dwyer *et al.*, 2006; O'Dwyer *et al.*, 2009; Spolidorio *et al.*, 2009; Demoner *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Perles *et al.*, 2019; Taques, 2020).

Em estudo conduzido por Gonçalves *et al.* (2021), *Babesia* spp. foi detectada parasitando populações de *D. albiventris* em dois locais do Cerrado, Brasília e Campo Grande, com uma alta taxa de infecção (32,83%). Além disso, também houve a detecção de *Babesia* spp. em carrapatos *A. dubitatum* coletados de *D. albiventris* de Campo Grande, fato que indica que esses ectoparasitas podem atuar como vetores do patógeno.

Segundo o estudo de Lopes *et al.* (2018), uma nova cepa de *Ehrlichia* foi identificada parasitando *Didelphis albiventris* no Estado do Rio Grande do Norte e foi denominada *Ehrlichia* sp. cepa Natal. Essa descoberta em áreas degradadas da Mata Atlântica é particularmente importante pois destaca a influência negativa das ações antrópicas no surgimento de novos agentes infecciosos (Carvalho *et al.*, 2020).

Tarragona (2022) detectou a presença da mesma cepa Natal em *Didelphis albiventris* na província de Formosa, na Argentina, marcando o primeiro relato desse parasitismo no país. As *Ehrlichias* detectadas no presente trabalho são relacionadas com *Ehrlichia* sp. cepa Natal descritas por Lopes *et al.* (2018). As análises filogenéticas que confirmaram a semelhança entre as cepas encontradas em ambas as regiões são de extrema importância e sugerem que esse patógeno possa ter um alcance geográfico maior do que o inicialmente pensado.

Nesse estudo, adicionamos novos dados sobre a ocorrência de *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. no Brasil, identificando cinco espécimes de *D. albiventris* infectados por *Babesia* sp. e dois espécimes de *D. albiventris* infectados por *Ehrlichia* sp. Esses resultados ressaltam a importância de novos estudos para melhor compreensão da ocorrência e distribuição de diversos patógenos em populações de animais silvestres.

A presença de patógenos como *Babesia* e *Ehrlichia* em um grupo amplamente distribuído, como os gambás, pode resultar em importantes implicações para a saúde pública, especialmente em regiões onde o contato com animais silvestres é frequente. Essas descobertas evidenciam a importância de investigar a relação entre patógenos, vetores e hospedeiros, além da necessidade de mais pesquisas em áreas de conservação e ambientes antropizados. Ressalta-se também a relevância dos gambás como importantes reservatórios de uma variedade de patógenos e, devido à sua ampla distribuição geográfica e contato com diferentes biomas e ecossistemas, a espécie desempenha papel significativo na dinâmica de doenças zoonóticas.

7 CONCLUSÃO

O aumento do contato de animais selvagens, domésticos e o ser humano, resultante da destruição dos habitats naturais e alterações climáticas, leva ao aumento do risco de transmissão de doenças zoonóticas. Decorrente do presente trabalho aqui apresentado, tem-se o primeiro relato publicado de diagnóstico molecular de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. infectando *Didelphis albiventris* no município de Botucatu, SP. Isso demonstra que estes patógenos, comuns em canídeos domésticos, também estão circulando na fauna selvagem, e têm o potencial de infectar seres humanos que entram em contato com esses animais.

Os valores de hemograma das duas espécies estudadas (*D. albiventris* e *D. aurita*) foram diferentes dos valores descritos na literatura. Resultado que evidencia a necessidade de estudos complementares acerca dos parâmetros hematológicos de gambás.

Ressalta-se ainda a importância de Centros de Triagem e Reabilitação de Animais Selvagens, Parques Zoológicos e Aquários na Conservação da Fauna

Silvestre e no âmbito da Saúde Única, funcionando como serviço de excelência na vigilância passiva de enfermidades em animais selvagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, D. M. Erliquiose. In: Jericó, M. M. (Org.). Tratado de medicina interna de cães e gatos. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 83, p. 2329-2346, 2015.

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, n. 1, p. 11-29, 1983.

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. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 88, 2012.

Almeida, A. P., Souza, T. D., Marcili, A., Labruna, M. B. Novel Ehrlichia and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. Journal of Medical Entomology, v. 50, n. 3, p. 640-646, maio, 2013.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403–410, oct, 1990.

Alves, L. A interação humano-animal: O apego interespecie. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Psicologia) – Instituição Evangélica de Novo Hamburgo, p. 82, 2019.

Alves, T. S. Ocorrência de *Hepatozoon* spp., Piroplasmas, *Ehrlichia* spp. e filarídeos em mamíferos silvestres de Centros de triagem de Minas Gerais e Goiás. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, p. 103, 2017.

André, M.R., Calchi, A.C., Perles, L., Gonçalves, L.R., Uccella, L., Lemes, J. R. B., Nantes, W.A.G, Santos, F.M, Oliveira, G.E.P., Barros-Battesti, D.M., Herrera, H.M., Machado, R. Z., 2022. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 13, n. 6, 2022.

Armando, C. Erliquiose canina: Revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biologia Animal: Animais de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, p. 30, 2022.

Astúa, D., De Le Sancha, N., Costa, L. *Didelphis aurita* (amended version of 2015 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021. e.T40500A197310366. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40500A197310366.en>. Acesso em: 6 ago. 2024.

Ayala, S.C., D'Alessandro, A., Mackenzie, R., Angel, D. Hemoparasite infections in 830 wild animals from the eastern Llanos of Colombia. *The Journal of Parasitology*, v. 59, n. 1, p. 52-9, fev. 1973.

Baneth, G., Shkap, V., Samish, M., Pipano, E., Savitsky, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 2- 4, p. 299-305, 1998.

Baneth, G., Mathew, J.S., Shkap, V., Macintire, D.K., Barta, J.R., Ewing, S.A., Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology*, v.19, n.1, p. 27-31, 2003.

Baneth, G., Samish, M., Shkap, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *The Journal of Parasitology*, v. 93, n. 2, p. 283-299, 2007.

Baneth, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 1, p. 3-11, 2011.

Barros, J. H. S., Xavier, S. C. C., Bilac, D., Lima, V. S., Dario, M.A., Jasen, A. M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Tropica*, v. 172, p. 173–179, mai. 2017.

Barros, M. W. D. Vida silvestre *ex situ*: perspectivas sobre as políticas públicas de conservação da fauna em cativeiro. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente. Recife, p. 140, 2023.

Bezerra-Santos, M. A., Ramos, R. A. N., Campos, A. K., Dantas-Torres, F., Otranto, D. *Didelphis spp.* opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*, v. 120, n. 12, p. 4091-4111, dec. 2021.

Bittencourt, J., Hiura, E., Sobral, A.S., Vieira, F.T., Braga, F.R., Tobias, F.L., Aguiar, D. M., Langoni, H. Ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do estado do Espírito Santo – Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v. 29, p. 1-9. 2022.

Bounos, D. I. Hoskins, J. D., Boudreaux, M. K. O Sistema Hematopoiético. In: Hoskins, J. D. (org). *Pediatria Veterinária*. São Paulo: Manole, p. 317-351, 1993.

Bouza-Mora L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J.; Salazar-Sánchez, L.; Labruna, M. B.; Aguiar, A. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 1, p. 36-40, 2016.

Braga, J. F. V., Silva, S. M. M. S., Babesiose canina: uma visão geral da doença. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 12, n. 2, p. 204-213, 2013.

Brandão, L. P., Hagiwara, M. K. Babesiose canina - Revisão. *Revista Clínica Veterinária*, v. 7, n. 41, p. 50-59, nov./dez. 2002.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde. Módulo de Princípios de Epidemiologia para o Controle de Enfermidades (MOPECE) - Módulo 2: Saúde e doença na população. p. 52, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Estabelece normas para a atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 jun. 2022. Seção 1, p. 74.

Cardoso, D., Carvalho, G. F. Terapia assistida por animais (TAA) - Os benefícios dos cães na vida humana: Revisão de literatura. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 2, p. 232- 241, jul/dez., 2021.

Carneiro, A.S., Teixeira, M.N., Rêgo, E.W., Oliveira, J.B. Parâmetros hematológicos de *Didelphis albiventris* (Linnaeus, 1847) de vida livre provenientes do município de Igarassú- Pernambuco- Brasil. *Medicina Veterinária*, v. 4, n. 2, p. 9-15. 2010.

Carvalho, B. M., Perez, L. P., Oliveira, B. F. A., Jacobson, L. S. V., Horta, M. A., Hacon, S. D. Doenças transmitidas por vetores no Brasil: mudanças climáticas e cenários futuros de aquecimento global. *Sustainability in Debate*, v. 11, n. 3, p. 383-404, dez. 2020.

Casagrande, R. A., Cesar, M. O., Horta, M. C., Rossi, S., Teixeira, R. H., Matushima, E. R. Perfil hematológico de gambás *Didelphis aurita* e *D. albiventris* do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 2, p. 185-189, 2009.

Castro, I. O., Minkoves, R. Babesiose. *In*: Cimerman, B., Cimerman, S. (org). *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Atheneu, p. 156-158, 1999.

Cavalcante, A. S. A. Aspectos parasitológicos e laboratoriais da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros em diferentes sistemas de criação intensiva. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, p. 95, 2021.

Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 37, apr., 2009.

CFMV Explica: Saúde Única. CFMV-SP, 2021. Disponível em: < <https://crmvsp.gov.br/videos/cfmv-explica-saude-unica/> >. Acesso em: 20/03/2024.

Codeço, C.T., Bastos, L. S., Araújo, E. C., Lana, R. M., Oliveira, S. S., Ferreira, D. A. C., Godinho, V. B., Loch, S., Vacaro, L. B., Riback, T. I. S., Almeida, I. F., Cruz, O. G., Coelho, F. C. Relatório 02/23 do Grupo Infodengue, PROCC/Fiocruz e EMap/FGV, p. 11, versão revisada em 26 de outubro de 2023.

Colle, A. C., Mendonça, R. F. B., Maia, M. O., Freitas, L. C., Witter, R., Marcili, A., Aguiar, D. M., Muñoz-Leal, S., Labruna, M. B., Rossi, R. V., Pacheco, R. C. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 28, n. 4, p. 592–604, out. 2019.

Costa, L. P., Astúa, D., Brito, D., Soriano, P., Lew, D. *Didelphis albiventris* (amended version of 2015 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021. e.T40489A197310863. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40489A197310863.en>. Acesso em: 6 ago. 2024.

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, n. 1, p. 93-99. feb. 2006.

Day, M. J. One health: The importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 49, p. 1-6, apr., 2011.

Demoner, L.C., Magro, N.M., Silva, M.R.L., Antunes, J.M.A.P, Calabuig, C.I.P., O'Dwyer, L.H. *Hepatozoon* spp. Infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Diseases*. v. 7, n. 5, p. 859-864, 2016.

Dias, V. A. C. M., Ferreira, F. L. A. Babesiose canina: Revisão. *Pubvet*, v. 10, n. 12, p. 886-888, dez., 2016.

Divisão da fauna silvestre. Prefeitura de São Paulo, 2023. Disponível em: < https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/servicos/fauna/index.php?p=3391 >. Acesso em: 19/07/2023.

Doyle, C. K., Labruna, M. B., Breitschwerdt, E. B., Tang, Y., 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, oct., 2005.

Duarte, S.C., Linhares, G.F.C., Romanowsky, T.N., Silveira Neto, O.J., Borges, L.M.F. Assessment of *primers* designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 1-2, p. 16-20, 2008.

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, n. 1, p. 45–52, 2008.

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, n. 1-2, p. 1-7, nov., 2005.

Forlano, M.D., Teixeira, K.R., Scofield, A., Elisei, C., Yotoko, K.S., Fernandes, K.R., Linhares, G.F., 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, n.1-2, p. 21-30, apr., 2007.

Gonçalves, L. R., Paludo, G., Bisol, T. B., Perles, L.; de Oliveira, L. B, de Oliveira, C. M., da Silva, T. M. V., Nantes, W. A. G., Duarte, M. A., Santos, F. M., Porfírio, G. E. de O., Hirano, L. Q. L., Herrera, H. M., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., André, M. R. Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). *Parasitology Research*, v. 120, n. 10, p. 3537-3546, 2021.

Gondim, L. F. P., Kohayagawa, A., Alencar, N.X., Biondo, A.W., Takahira, R.K., Franco, S.R. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.

Guimarães, A., Raimundo, J. M., da Silva, A. T., Carpintero, F. M., Pires, J. R., Benevenuto, J. L., Machado, R. Z., André, M. R., Baldani, C. D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 140-144, jan.-mar., 2019.

Harris, D.J., Sergiadou, D., Halajian, A., Swanepoel, L., Roux, F. Molecular screening indicates high prevalence and mixed infections of *Hepatozoon* parasites in wild felines from South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 91, n. 0, p. 1-5, nov., 2020.

História do Zoo. Prefeitura de Sorocaba, 2023. Disponível em: < <https://www.sorocaba.sp.gov.br/zoologico/historia/>>. Acesso em: 19/07/2023.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Instrução Normativa IBAMA nº 07, de 30 de abril de 2015, Diário Oficial Da União. Publicado em: 11 de maio de 2015, seção: 01, página 75.

Jansen, A. M., Xavier, S. C. das C., Roque, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 11, n. 502, p. 1-25, 2018.

Johnson, E.M., Allen, K. E., Breshears, M. A., Panciera, R. J., Little, S. E., Ewing, S. A. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. *Veterinary Parasitology*, v. 151, n. 2-4, p. 164–169, feb., 2008.

Khasnis, A.A., Nettleman, M.D. Global warming and infectious disease. *Archives of Medical Research*, v. 36, n. 6, p. 689-96, nov-dec., 2005.

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, n. 1, p. 149- 153, jan., 2000.

Kubo, M., Uni, S., Agatsuma, T., Nagataki, M., Panciera, R.J., Tsubota, T., Nakamura, S., Sakai, H., Masegi, T., Yanai, T. *Hepatozoon ursi* n. sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *Parasitology International*, v. 57, n. 3, p. 287–294, sep, 2008.

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, n. 2, p. 189–195, jan., 2007.

Lemos, T. D., Cerqueira, A. M. F., Toma, H. K., Silva, A. V., Corrêa, R. G. B., Paludo, G. R., Massard, C. L., Almosny, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 137-142, abr.-jun. 2012.

Lobetti, R.G., Dvir, E., Pearson, J. Cardiac troponins in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16, n. 1, p.63-68, jan-feb., 2002.

Lopes, M.G., Muñoz-Leal, S., de Lima, J.T.R., Fournier, G.F.D.S.R., Acosta, I.D.C.L., Martins, T.F., Ramirez, D.G., Gennari, S.M., Labruna, M.B. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. *International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife*. v. 7, n. 3, p. 380-385, oct, 2018.

Lopes, W. D. Z., Martins, J. R. de S., Costa, A. J., Soares, V. E., Teixeira, W. F., Cruz, B. C., Maciel, W., Felippelli, G., Carvalho, R. S. Aspectos da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos experimentalmente infectados. *Veterinária e Zootecnia*, v. 23, n. 2, p. 272–284, 2022.

Macedo, L. P. F., Lima, M. F. Erlichiose canina: uma revisão de literatura. Revista Científica Mais Pontal, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2023.

Machado, D. S., Machado, J. C., Souza, J. O. T., Sant'Anna, A. C. A importância da guarda responsável de gatos domésticos: aspectos práticos e conexões com o bem-estar animal. Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 19, p. 1-13, jun., 2019.

Maia, J.P., Crottini, A., Harris, D.J. Microscopic and molecular characterization of *Hepatozoon domerguei* (Apicomplexa) and *Foleyella furcata* (Nematoda) in wild endemic reptiles from Madagascar. Parasite v. 21, n. 47, p. 1-14, 2014.

Marques, J. W. S., Azevedo, R. C. F., Fakelmann, T. Costa, J. O. J., Nieri-Bastos, F. A., Marcili, A. Hepatozoonose em mamíferos silvestres e domésticos: Revisão de literatura. Brazilian Journal of Development, v.8, n.1, p. 140-156, 2022.

Melo, A. L. T., Aguiar, D. M. D., Spolidorio, M. G., Yoshinari, N. H., Matushima, E. R., Labruna, M. B., Horta, M. C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 25, n. 3, p. 348-352, 2016.

Mendoza-Roldan, J.A., Ribeiro, S.R., Castilho-Onofrio, V., Marcili, A., Simonato, B.B., Latrofa, M.S., Benelli, G., Otranto, D., Barros-Battesti, D.M. Molecular detection of vector-borne agents in ectoparasites and reptiles from Brazil. Ticks Tick Borne Diseases, v. 12, n.1, p. 1-9, oct, 2021.

Merino, S., Vásquez, R.A., Martínez, J., Celis-Diez J.L., Gutiérrez-Jiménez, L., Ippi, S., Sánchez-Monsalvez, I., La Puente, J. M. Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the “living fossil” marsupial “Monito del Monte” *Dromiciops gliroides* from Chile. Biological Journal of the Linnean Society, v. 98, n. 3, p.568–576, 2009.

Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 489, de 26 de outubro de 2018, Diário Oficial da União. Publicado em: 29/10/2018, edição: 208, seção: 1, página: 69.

Moraes, L. F., Takahira, R. K., Golim, M. A. & Baggio, M. S. Avaliação das alterações hemostáticas e do risco tromboembólico em cães com AHIM. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. 5, p. 405-411, 2016.

Moreira, Silvia Bahadian. Aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: *Didelphidae*) da Serra dos Órgãos, RJ. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 132, 2013.

Mundim, A. V., Mundim, M.J.S, Jensen, N. M. P., Araújo, S.F. *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, v. 10, n. 1, p. 89-95, 1994.

Mundim, A. V., Morais, I. A., Tavares, M., Cury, M. C., Mundim, M. J. S. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon*

sp. and with other hematozoa. A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008.

Nascimento, C. C., Horta, M. C. Didelphimorphia (Gambá e Cuíca). In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., Catão-Dias, J. L. (org.). *Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca, p. 761-788, 2014.

Nelson, R. W., Couto, C. G. *Medicina interna de pequenos animais*. 5ª ed. Amsterdam: Elsevier, p. 3969-3973, 2015.

O'Dwyer, L.H., Massard, C.L., Pereira de Souza, J.C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 94, n. 3, p.143-150. jan., 2001.

O'Dwyer, L. H., Saito, M. E., Hasegawa, M. Y., Kohayagawa, A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 688-690, 2006.

O'Dwyer, L. H., Lopes, V. V., Rubini, A. S., Paduan, K. dos S., Ribolla, P. E. M. *Babesia* spp. Infection in dogs from rural areas of São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 18, n. 2, p. 23-26, 2009.

O'Dwyer, L.H. Brazilian canine hepatozoonosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 3, p. 181-193, sep., 2011.

Olicheski, Adriana Tarnowski. Comparação entre os métodos de coloração panóptico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de Riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 87, 2003.

Osório, H. C., Amaro, F., Silva, M. M. S., Velez, R., Santos, A. S. Artrópodes e roedores associados à transmissão de agentes infecciosos. In: Nuncio, M. S., Alves, M. J. *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. 2ª ed. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, cap. 1, p. 15-52, 2019.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Stanneck, D., Decaprarriis, D., Capelli, G., Baneth, G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 55, p. 55-60, apr., 2011.

Paludo, G. R., Dell'Porto, A., Trindade, A.R.C., MCManus, C., Friedman, H. *Hepatozoon* spp.: Report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 118, n. 3-4, p. 243-248, dec., 2003.

Paludo, G. R., Friedmann, H., Dell'Porto, A., Macintire, D.K., Whitley, E.M., Boudreaux, M.K., Baneth, G., Blagburn, B.L., Dykstra, C.C. *Hepatozoon* spp.

pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitology Research*, v. 97, n. 2, p. 167-170, sep., 2005.

Pereira, B. L. A. R., Sorte, E. C. B., Borges, J. C., Mendonça, A. J. Ocorrência de *Babesia* spp. em cães utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. 1-8, feb., 2021.

Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 9, p. 2133–2139, sep., 1996.

Perles, Livia. Diversidade genética de *Hepatozoon* spp. em roedores no Brasil. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, p. 89, 2019.

Perles, L., Roque, A. L. R., D'Andrea, P. S., Lemos, E. R. S., Santos, A. F., Morales, A. C., Machado, R. Z., André, M. R. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil. *Scientific Reports*, v. 9, n. 10122, p. 1-9, jul., 2019.

Pinter, A. Febre maculosa brasileira no contexto de saúde única. *Journal Health NPEPS*, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2023.

Rabelo, Fernanda Almeida. Doenças transmitidas por vetores em canídeos na região da Serra do Amolar, Pantanal, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, p. 56, 2014.

Ramos, C. A. N., Ramos, R. A. N., Araújo, F. R., Guedes Jr., D. S., Souza, I. I. F., Ono, T. M., Vieira, A. S., Pimentel, D. S., Rosas, E. O., Faustino, M. A. G., Alves, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 1, p. 58–62, dez. 2009.

Ribeiro, S. R. Investigação de hemoparasitas do gênero *Hepatozoon* em ácaros da ordem Mesostigmata e em serpentes no Instituto Butantan. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro, São Paulo, p. 42, 2019.

Rodrigues, Larissa Pereira. Investigação da presença de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos silvestres no município de Botucatu, São Paulo. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, p. 71, 2022.

Roque, A.L.R.; Jansen, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

Rossi, R. V., Bianconi, G. V., Pedro, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: Reis, N. R., Peracchi, A.L., Pedro, W. A., Lima, I. P. Mamíferos do Brasil. Londrina: UEL, p. 27-66, 2006.

Sambrook, J.; Russell, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Santos, E. C. F. Análise dos cenários propensos à ocorrência de *Babesia*, *Hepatozoon* e *Theileria* em fragmentos de Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 150, 2020.

Santos, J. B., Silva, A. L. F., Rodrigues, M. V., S., Santos, R. F., Jayme, V. S., Fioravanti, M. C., S. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral no contexto da Saúde Única: uma revisão. Revista Eletrônica Interdisciplinar, v. 16, n. 1, p. 1-23, 2024.

São Paulo. Governo do Estado. Secretaria da Saúde. Plano Estadual de Contingência das arboviroses urbanas: Dengue, Chikungunya e Zika: 2023/2024. São Paulo, p. 1-33, 2022.

Silva, J. R., Meirelles, G. P., Zavilenski, R. B., Gravinatti, M. L., Silva, J. P. M., Bertéli, M. B. D., Martins, R. R., Ribeiro, M. G., Ribeiro, L. V. P. Avaliação do perfil renal de equinos submetidos ao tratamento com dipropionato de imidocarb. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 9, n.1, p. 57-58, 2011.

Silva, M. R. L., Fornazari, F., Demoner, L. C., Teixeira, C. R., Langoni, H., O'Dwyer, L. H. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. Ticks Tick Borne Disease. v. 8, n. 6, p. 878-881. oct. 2017.

Smith, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). The Journal of Parasitology, v. 82, n. 4, p. 565-85, aug.,1996.

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. Tese (Doutorado em Reumatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 86, 2009.

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. 357-61, aug., 2009.

Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Machado, R. Z., Moraes-Filho, J., Zago, A.M., Donatele, D.M., Silveira, I., Caliari, K. M., Yoshinari, N.H. Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 83, n. 1, p. 201-206, jul., 2010.

Soares, J. F. Piroplasmoses. In: Jericó, Márcia Marques (Org.). Tratado de medicina interna de cães e gatos. 1ª ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 2277-2317, 2015.

Soares, H.S., Marcili, A., Barbieri, A.R., Minervino, A.H., Moreira, T.R., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 6, n. 2, p.115-121, 2017.

Sousa, K.C., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Benevenuto, J.L., Santos, F.M., Rocha, F.L., Barreto, W.T., Macedo, G.C., Campos, J.B., Martins, T.F., Andrade Pinto, P.C., Battesti, D.B., Piranda, E.M., Cançado, P.H., Machado, R.Z., André, M.R. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. Veterinary Parasitology, v. 15, n. 237, p. 37-46, apr., 2017.

Taboada, J.; Merchant, S.R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Manole, p.554-572, 1997.

Taques, I. I. G. G. Análise clínico-patológica e soroepidemiológica pelo uso de peptídeos sintéticos de proteínas TRP de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* no Brasil. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p.77, 2020.

Tarragona, E.L.; Zurvera, D.; Manzoli, D.E.; Correa, A.I.; Delgado, A.R.; Mastropaolo, M.; Barengo, E.; Beldomenico, P.M. Parámetros hematológicos de la comadreja overa, *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), de poblaciones silvestres del centro de la Argentina. Investigación Veterinaria, v. 13, n. 2, p. 97-105, dic., 2011.

Tarragona, E.L., Flores, F.S., Lamattina, D., Torrents, J., Sebastian, P.S., Nava, S. Two novel *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains detected in ticks (*Ixodida*, *Ixodidae*) and opossums (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*) in Argentina. Ticks Tick-Borne Diseases, v. 13, n. 6, p. 102043, nov., 2022.

Teixeira, R. S. Investigação de *Borrelia* spp. e alterações hematológicas associadas em gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) de vida livre no estado do Rio Janeiro. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 59, 2021.

Telford Junior, S. R. Three new *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. The Journal of Parasitology, v. 96, n. 1, p. 162–169, fev., 2010.

Tomé, B., Maia, J.P., Salvi, D., Brito, J.C., Carretero, M.A., Perera, A., Meimberg, H., Harris, D.J. Patterns of genetic diversity in *Hepatozoon* spp. infecting snakes from North Africa and the Mediterranean Basin. Systematic Parasitology, v. 87, n. 3, p. 249–258, mar., 2014.

Uilenberg, G. Babesia - A historical overview. Veterinary Parasitology, v.138, n. 1-2, p. 3–10, may., 2006.

Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. D. C., Nascimento, D. A. G., Tamekuni, K., Toledo, R. D. S., Chandrashekar, R., Marcondes, M., Biondo, A. W., Vidotto, O. Serosurvey of tickborne pathogens in dogs from urban and rural areas from Paraná State, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 22, n. 1, p. 104-109, jan-mar., 2013.

Vigilância Ambiental em Saúde. Prefeitura de Botucatu, 2023. Disponível em: <<https://www.botucatu.sp.gov.br/portal/secretarias-paginas/19/vigilancia-ambiental-em-saude/>>. Acesso em: 09/08/2023.

Weck, B. C. Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, p.75, 2022.

Zecca, I.B., Hodo, C.L., Slack, S., Auckland, L., Hamer, A.S. *Trypanosoma cruzi* infections and associated pathology in urban-dwelling Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. v. 10, n. 11, p. 287–293, mar., 2020.

CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a International Journal for Parasitology – Parasites and Wildlife

Normas disponíveis em: <https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-for-parasitology-parasites-and-wildlife/publish/guide-for-authors>

INVESTIGATION OF VECTOR-BORNE PATHOGENS AND HEMATOLOGICAL PROFILE OF OPOSSUMS (*DIDELPHIS ALBIVENTRIS* AND *DIDELPHIS AURITA*) IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Stephany Rocha Ribeiro^{1*}, Paula Sader Teixeira², Ticiana Zwarg Dias Bianchi³, Larissa Pereira Rodrigues¹, João Otávio Mochiuti¹, Catharina Eulasya Viana Resende⁴, Gilberto Salles Gazeta⁵, Ana Beatriz Borsoi⁵, Karla Bitencourth⁵, Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira^{1,6,7}, Lígia Souza Lima Silveira da Mota^{1,8}

¹Postgraduate Program in Wild Animals, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Anhanguera University, Sorocaba, São Paulo, Brazil

³Division of Wildlife, São Paulo City Hall, São Paulo, Brazil

⁴School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil

⁵Laboratory of Ticks and Other Apterous Arthropods, Collection of Apterous Arthropod Vector of Community Health Importance – Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Sorocaba University, Sorocaba, São Paulo, Brazil

⁷Municipal Zoological Park “Quinzinho de Barros”, Sorocaba, São Paulo, Brazil

⁸Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

*Corresponding author (E-mail address: stephany.rocha@unesp.br)

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate, parasitologically and molecularly, the presence of vector-borne agents in free-living white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and black-eared opossums (*Didelphis aurita*) in the state of São Paulo, in addition to tracing the hematological profile of these animals. The hosts analyzed were rescued by the Municipal Zoological Park “Quinzinho de Barros”, in Sorocaba; the Wildlife Management and Conservation Center - CeMaCAS, in São Paulo; and by the Botucatu Environmental Health Surveillance. From the material collected (whole blood), blood counts were taken from 51 animals in order to analyze the values of the hematological parameters of the two host species, as well as blood smears from 77 individuals to search for pathogens using optical microscopy. Molecular analysis was also used to search for DNA fragments of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp. in 115 hosts, using specific primer pairs for each pathogen. Of the 77 blood smears taken, one (1.29%) showed the presence of morulae suggestive of *Ehrlichia* spp. None of the blood smear slides were positive for the protozoa investigated. Of the 115 animals analyzed, five (4.34%) were positive in the conventional PCR test for *Babesia* spp. based on the 18S rRNA gene. Two (1.73%) samples were positive in the *Nested*-PCR for *Ehrlichia* spp. based on the *dsb* gene. No samples were positive for protozoa of the genus *Hepatozoon* spp. Using bioinformatics tools, it was possible to confirm the positivity of *Babesia* sp. and *Ehrlichia* sp. The sample that showed morulae in the parasitological test was from *Didelphis aurita* from the municipality of Sorocaba/SP and all the samples that tested positive in the molecular tests were *Didelphis albiventris* from the municipality of Botucatu/SP. These results highlight the importance of further studies to better understand the occurrence and distribution of various pathogens in wild animal populations.

Key words: Hemoparasites, hematological parameters, marsupial, molecular biology, parasitology, wildlife.

1. INTRODUCTION

Environmental changes, generally resulting from anthropogenic actions such as the disorderly growth of urban centers and the destruction of natural habitats, can influence the geographical range of vectors responsible for disease transmission, impacting the epidemiology of infectious diseases (Khasnis and Nettleman, 2005; Rabelo, 2014; Carvalho *et al.*, 2020). As a result of these events, wild animals approach urban areas in search of shelter and food, intensifying contact with domestic animals and humans and, consequently, increasing the risk of transmitting zoonotic pathogens (Carvalho *et al.*, 2020).

The genus *Didelphis* belongs to the family Didelphidae, Order Didelphimorphia and has six species described on the American continent; of these, four occur in Brazil (Nascimento and Horta, 2014). They are marsupials with crepuscular/nocturnal habits, arboreal, opportunistic, solitary and generalist feeding habits, and are considered synanthropic animals because they have the ability to adapt to rural, peri-urban and urban environments (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento and Horta, 2014; Bezerra-Santos *et al.*, 2021). They play an important ecological role as seed dispersers, pest controllers and in cleaning up the environment by feeding on dead animals (Rossi *et al.*, 2006; Nascimento and Horta, 2014). They act in the epidemiology of various parasitic diseases, as they are considered disseminators of parasites such as arthropods, helminths and protozoa (Ayala *et al.*, 1973; Nascimento and Horta, 2014; Roque *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2017).

Among these agents are the protozoa *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. and the bacterium *Ehrlichia* spp., responsible for causing babesiosis, hepatozoonosis and ehrlichiosis, respectively (Spolidorio, 2009; Bittencourt *et al.*, 2022). These pathogens share the same arthropod vector, the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus sensu lato*), the main vector of these pathogens in Brazil, and parasitize domestic, wild animals and humans (accidental host) (Labruna *et al.*, 2007; Spolidorio, 2009; Alves, 2017).

Pathogens of the genus *Babesia* spp. are intracellular protozoa belonging to the family Babesiidae and order Pirolasmida, which parasitize the blood cells of vertebrate animals and are transmitted mainly through the inoculation of sporozoites present in the saliva of the vector at the time of blood transfusion (Brandão and Hagiwara, 2002; Olicheski, 2003; Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009; Braga and Silva, 2013; Vieira *et al.*, 2013; Soares, 2015; Dias and Ferreira, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022).

The genus *Hepatozoon* spp. comprises apicomplexous protozoa belonging to the family Hepatozoidae and order Eucoccidiorida, which can infect various vertebrate hosts and are transmitted mainly through ingestion of the infected definitive invertebrate host containing oocysts, but can also occur secondarily through predation of an infected intermediate vertebrate host containing cysts (prey-predator cycle) (Smith, 1996; Baneth *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2008; Telford, 2010; Maia *et al.*, 2014; Mendoza-Roldan *et al.*, 2021).

Ehrlichia spp. are obligate intracellular gram-negative bacteria with zoonotic potential, which belong to the family Anaplasmataceae and order Rickettsiales, infect mainly mammalian leukocytes and are transmitted mainly during blood transfusions by ticks (Aguiar, 2015; Taques, 2020; Armando, 2022; Bittencourt *et al.*, 2022).

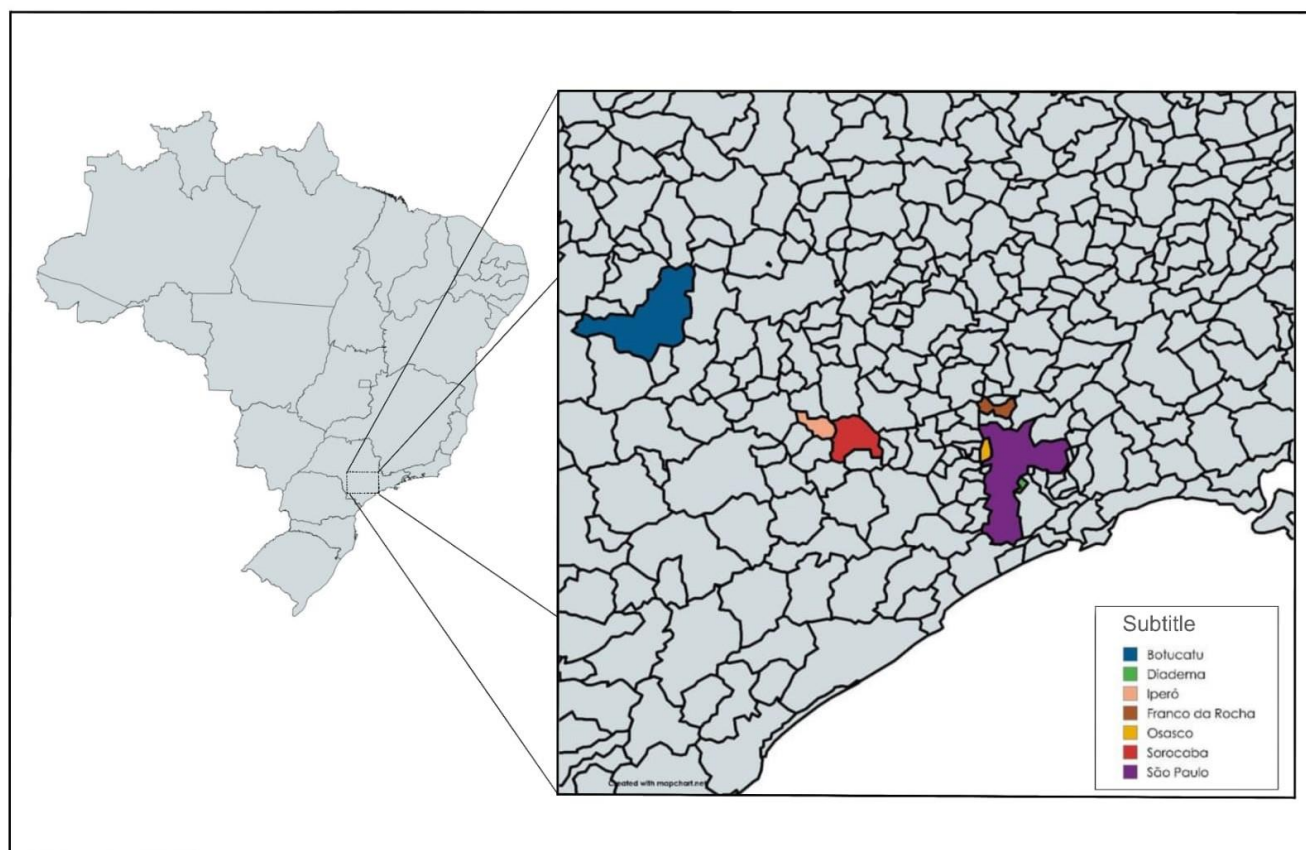
This study focused on assessing the occurrence of *Babesia*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia* in blood of free-living opossums from state São Paulo, by means of parasitological and molecular analyses, as well as tracing the hematological profile of these animals by means of a complete blood count.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area

This study was carried out at the Municipal Zoological Park “Quinzinho de Barros” (PZMQB) in Sorocaba, at the Wildlife Management and Conservation Center (CeMaCAS), in São Paulo city, and at the Environmental Health Surveillance (VAS), in Botucatu. The samples were from seven municipalities in the state of São Paulo, namely Botucatu, Diadema, Franco da Rocha, Iperó, Osasco, São Paulo and Sorocaba (Figure 1).

Figure 1. Geographical locations where the biological samples of the opossums included in this study were collected.



Source: Google Earth

2.2 Sample collection

The samples were obtained by puncturing the jugular, femoral or lateral coccygeal veins during routine examinations and/or when the animals were admitted to the institutions. The material obtained was stored in microtubes containing EDTA. Part of the biological samples was refrigerated for laboratory analysis (blood count and blood smear), while another part was frozen at -20°C until DNA extraction for molecular analysis.

2.3 Hematological evaluation

To evaluate the main cell lineages (erythrocytes, leukocytes and platelets), a complete blood count was taken of 32 *Didelphis albiventris* (white-eared opossum) and 19 *Didelphis aurita* (black-eared opossum). Hematocrit was measured by centrifuging capillaries filled with blood. Hemoglobin was obtained using the cyanomethemoglobin

method (LabTest®) and read on a semi-automated biochemical device (Bioplus®). The hematimetric indices were obtained according to the formulas established for domestic animals. The total protein value was obtained using a refractometer. Cell counts were carried out in a Neubauer chamber using Gower's liquid and Turk's liquid as diluents. The platelet count was estimated on a slide. The leukocyte differential and cell morphology analysis were performed by counting blood smears stained with rapid Panoptic.

2.4 Microscopic analysis

The morphological evaluation of the infective forms of the pathogens was performed by analyzing blood smear slides. A blood capillary was filled and taken to the centrifuge to separate the blood components (plasma and platelets + white blood cells and red blood cells), and blood smear slides were made from the buffy coat.

2.5 Molecular analysis

DNA was extracted using the phenol/chloroform method described by Sambrook and Russel (2001), with modifications. A spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) was used to quantify the DNA using absorbance at 260-280nm. The quality of the material was assessed using the 1.5% agarose gel electrophoresis technique, stained with Gel Red (Uniscience) (0.1µL/10 mL), immersed in TAE 1X buffer (Tris-Acetic Acid - EDTA) and viewed on an image scanner under ultraviolet light. To investigate the presence of DNA fragments of the pathogens in the blood samples of the animals studied, conventional PCR (*Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp.) and Nested-PCR (*Ehrlichia* spp.) were performed in an AmpliGene Lite thermal cycler (Loccus). The primer sets used in this work, as well as the main information and references are listed in table 1.

PCR analyses for *Babesia* spp. were performed using the primer pairs BAB143-167 forward and BAB858-834 reverse, which amplify a fragment of approximately 715pb of *Babesia* spp. from the 18S rRNA gene (Lemos *et al.*, 2012). The PCR consisted of an initial denaturation for 5 minutes at 95°C, 40 repetitive cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 64°C, 1 minute at 72°C, followed by a final extension of 5 minutes at 72°C (Lemos *et al.*, 2012).

For *Hepatozoon* spp., PCR analyses were performed with the primer pairs Hep144-169 forward and Hep743-718 reverse, which amplify a fragment of approximately 574pb of *Hepatozoon* spp. from the 18S rRNA gene (Almeida, 2012). The PCR consisted of an initial denaturation for 5 minutes at 95°C, 35 repetitive cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 50°C, 1 minute at 72°C, followed by a final extension of 7 minutes at 72°C (Almeida, 2012).

For *Ehrlichia* spp. a first PCR reaction was performed with the primer pairs DSB-330 forward and DSB-720 reverse which amplify a fragment of 401pb and 349pb, respectively, from the *dsb* gene, as described by Doyle *et al.* (2005) and Almeida (2012). With the pairs of primers named DSB-380 forward and DSB-720 reverse, which amplify a 349pb fragment of the *dsb* gene, the Nested-PCR technique was performed (Almeida, 2012). The temperature cycles followed the protocol cited by Almeida (2012) and the first PCR reaction consisted of an initial denaturation for 3 minutes at 95°C, 35 repetitive cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 50°C, 30 seconds at 72°C, followed by a final extension of 5 minutes at 72°C. In Nested-PCR, initial denaturation for 3 minutes at 95°C, 30 repetitive cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 52°C, 30 seconds at 72°C, followed by a final extension of final extension of 5 minutes at 72°C.

The PCR reactions were performed with a total final volume of 25uL, containing 2.5 uL 10X Buffer devoid of MgCl₂ (Invitrogen, Massachusetts, USA), 0.75 uL of MgCl₂

(Invitrogen, Massachusetts, USA), 0.5 uL dNTP (Cellco Biotech, São Paulo, Brazil), 0.5 uL of each primer, 0.2 uL of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Massachusetts, USA), 2.0 uL of genomic DNA and 18.05 uL of ultrapure water free of DNase and RNase. In the case of PCR for *Ehrlichia* spp., the first reaction included 0.5 uL of the DSB-330 sense primer, 0.5 uL of the DSB-720 anti-sense primer and 2.0 uL of genomic DNA, and the second reaction (*Nested*-PCR) included 0.5 uL of the DSB380 primer, 0.5 uL of the DSB-720 primer and 2uL of the amplicon from the first reaction. DNA from *Babesia vogeli*, *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp. was used as a positive control, and ultrapure water free of DNase and RNase was used as a negative control in each reaction.

To visualize the amplified DNA fragment, the PCR amplicons were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel, immersed in TAE 1X buffer (Tris-Acetic Acid - EDTA) and run in a horizontal vat (Loccus LCH-13x15) at 90V for 50 minutes and after the run, the gels were stained with ethidium bromide and visualized on a transilluminator (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, UK) with UVP® VisionWorksLS™ software (LifeScience Software) compared to a 1 Kb Plus molecular weight standard (Uniscience). Samples that showed bands at the height of the positive controls were considered positive.

The PCR products that showed the expected band size were purified using the commercial kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions and submitted to the sequencing reaction. DNA was sequenced in both directions in an automated ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) and the same PCR primers and the BigDye Terminator™, version 3.1 Cycle Sequencing® Kit (Applied Biosystems) were used in sequencing reactions. The sequences obtained were edited using the Chromas Pro, version 1.5 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) and submitted to identification of similarity with known sequences using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) to check for homology with corresponding sequences available in GenBank (Altschul *et al.*, 1990). Phylogenetic reconstructions were made using maximum likelihood analysis with PHYML, version 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) and the evolutionary model indicated by MEGA, version 6.0 through BIC (*Babesia* T93+G; *Ehrlichia* T92+G). An approximate likelihood ratio test (aLRT), with 1000 replicas, was used to estimate branch robustness.

Table 1. Primer sequences used for the amplification of target sequences of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp.

Agent	Gene	Primer pair	Primers sequence 5' – 3'	Amplified fragment (bp)	Bibliographic reference
<i>Babesia</i> spp.	18S rRNA	BAB143-167	F - CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	715 bp	Lemos <i>et al.</i> , 2012
		BAB858-834	R – CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCC		
<i>Hepatozoon</i> spp.	18S rRNA	HEP-F	F - GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574 bp	Almeida, 2012
		HEP-R	R – ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG		
<i>Ehrlichia</i> spp.	dsb	DSB-330	F - GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401 bp	Doyle <i>et al.</i> , 2005
		DSB-380	F - ATTTTATAGGATTTTCCAATACTTGG	349 bp	
		DSB-720	R – CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		

Source: Author

3 RESULTS

3.1 Sample collection

A total of 115 blood samples were obtained from individuals of the species *Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita* when they were admitted to the institutions, regardless of the health status of each one. The group consisted of 95 *D. albiventris* and 20 *D. aurita*, of which 28.70% were males, 50.43% were females and 20.87% were animals of indeterminate sex. Of these, 13.91% were joeys, 13.91% were juveniles and 72.18% were adults.

3.2 Ectoparasites

Of the animals from the PZMQB, six opossums were infested with fleas of the species *Ctenocephalides felis*, two opossums with *Amblyomma longirostre* ticks and one animal with L2 larvae of *Cochliomyia hominivorax*. At CeMaCAS, two opossums were parasitized by fleas, one by ticks and one by a mite. In the VAS, six opossums were infested with fleas and two were parasitized by ticks. Morphological identification of the ectoparasites from CeMaCAS and VAS was not carried out. No molecular analysis was carried out on the ectoparasites collected.

3.3 Hematological evaluation

Complete blood counts were performed on 32 animals from PZMQB and 19 from CeMaCAS, immediately after blood collection, totaling 51 samples, using fresh whole blood. Of the samples from *D. albiventris*, the mean values obtained were: red blood cells $3.7 \times 10^6/\mu\text{L}$, hemoglobin 9.0g/dL, hematocrit 30.33%, VCM 84.12fL, HCM 24.90pg, CHCM 29.77%, erythroblasts 0.9/100 leu, total leukocytes $12.269.12/\mu\text{L}$, rod neutrophils $0.28 \times 10^6/\mu\text{L}$, segmented neutrophils $46.53 \times 10^6/\mu\text{L}$, lymphocytes $46.75 \times 10^6/\mu\text{L}$, eosinophils $3.74 \times 10^6/\mu\text{L}$, monocytes $2.25 \times 10^6/\mu\text{L}$, basophils $0 \times 10^6/\mu\text{L}$, platelets 230,245. / μL and total plasma protein 7.8g/dL (table 2).

Table 2. Minimum, maximum, mean and standard deviation values for the hematological parameters of *Didelphis albiventris* from the state of São Paulo.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS				
	<i>Didelphis albiventris</i>			Reference*
	Minimum	Maximum	Mean (standad deviation)	Mean
Red blood cells ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2,14	5,3	3,72 ($\pm 0,74$)	4,16
Hemoglobin (g/dL)	4,9	12,3	9,0 ($\pm 2,08$)	10,3
Hematocrit (%)	17	45	30,33 ($\pm 5,96$)	34,35
VCM (fL)	62,2	117,11	84,12 ($\pm 11,16$)	90,25
HCM (pg)	14,4	31,7	24,90 ($\pm 3,60$)	28
CHCM (%)	22,68	44,4	29,77 ($\pm 4,23$)	33,9
Erythroblasts /100 Leu	0	14	0,90 ($\pm 3,44$)	-
Total leukocytes (/uL)	2100	24 900	12 269,12 ($\pm 4795,64$)	9 480
Rod neutrophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	7	0,28 ($\pm 1,25$)	4,6
Segmented neutrophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	18	69	46,53 ($\pm 11,95$)	47,44
Lymphocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	25	78	46,75 ($\pm 11,45$)	41,56
Eosinophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	15	3,74 ($\pm 3,72$)	3,5
Monocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	4	2,25 ($\pm 1,24$)	3,2
Basophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	0	0 (± 0)	1
Platelets (/uL)	26 600	1 292,000	230 245,16 ($\pm 228084,83$)	-
Total plasma protein (g/dL)	7,2	8,2	7,8 ($\pm 0,58$)	5,6

* Reference values: Tratado de animais selvagens, 2014.

Source: Author

For *D. aurita*, the average values were: red blood cells $4.05 \times 10^6/\mu\text{L}$, hemoglobin 10.86g/dL, hematocrit 36.08%, VCM 93.08fL, HCM 27.87pg, CHCM 30.05%, erythroblasts 0.72/100-leu, total leukocytes $11.342.21/\mu\text{L}$, rod neutrophils $0 \times 10^6/\mu\text{L}$, segmented neutrophils $55.78 \times 10^6/\mu\text{L}$, lymphocytes $24.05 \times 10^6/\mu\text{L}$, eosinophils $12.84 \times 10^6/\mu\text{L}$, monocytes $2.78 \times 10^6/\mu\text{L}$, basophils $0.84 \times 10^6/\mu\text{L}$, platelets 485,470.58/ μL and total plasma protein 6.9g/dL (table 3).

Table 3. Minimum, maximum, mean and standard deviation values for the hematological parameters of *Didelphis aurita* from the state of São Paulo.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS				
	<i>Didelphis aurita</i>			Reference*
	Minimum	Maximum	Mean (standard deviation)	Mean
Red blood cells ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,67	6,42	4,05 ($\pm 1,41$)	5,40
Hemoglobin (g/dL)	1,8	16,9	10,86 ($\pm 3,57$)	12,78
Hematocrit (%)	6	52	36,08 ($\pm 9,94$)	38,66
VCM (fL)	63,36	130,58	93,08 ($\pm 19,34$)	71,69
HCM (pg)	16,27	36,02	27,87 ($\pm 7,08$)	-
CHCM (%)	23,26	38,41	30,05 ($\pm 5,08$)	33,01
Erythroblasts /100 Leu	0	8	0,72 ($\pm 1,96$)	-
Total leukocytes (/uL)	2415	29 190	11 342,21 ($\pm 6835,45$)	19 678,52
Rod neutrophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	0	0 (± 0)	0,77
Segmented neutrophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	20	88	55,78 ($\pm 15,56$)	41,12
Lymphocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1	50	24,05 ($\pm 12,63$)	41,97
Eosinophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1	32	12,84 ($\pm 8,97$)	13,79
Monocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	10	2,78 ($\pm 2,30$)	1,75
Basophils ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0	5	0,84 ($\pm 1,26$)	0,59
Platelets (/uL)	22 000	1 720,000	485 470,58 ($\pm 422004,76$)	514,70
Total plasma protein (g/dL)	5,4	8,2	6,9 ($\pm 0,86$)	7,95

*Reference values: Moreira, 2013.

Source: Author

3.4 Microscopic analysis

The results obtained in the evaluation of the blood smear slides were the presence of morulae compatible with *Ehrlichia* spp. in one animal (1.29%), suggestive of ehrlichiosis (Aguiar, 2015; Bouza-Mora *et al.*, 2016; Taques, 2020; Armando, 2022; Macedo and Lima, 2023). In another slide, the presence of intraplatelet inclusions suggestive of *Anaplasma* spp. was also observed in 1/77 (1.29%) (Ramos, 2009; Cavalcante, 2021; Lopes *et al.*, 2022). There were no positive results in the parasitological research of the protozoa investigated.

3.5 Molecular analysis

The molecular results indicated that, of the 115 samples evaluated, five amplified the expected fragment size for *Babesia* spp. All these five sequences presented 100.00% identity with the *Babesia* sp. GP1 isolate (MW290046). Of these animals, four were female and one male, all from the municipality of Botucatu/SP. Another two samples showed the expected fragment size for the *dsb* gene and were considered positive for *Ehrlichia* spp., both from female animals, also from the municipality of Botucatu/SP. One of these sequences, corresponding to the sample 66, showed 100.00% identity with *Uncultured Ehrlichia* sp. clone GNa (KY207546) and with *Ehrlichia* sp. isolate DA5.1 (OP270482), the second sequence, corresponding to the sample 111, exhibited 99.71% identity with *Ehrlichia* sp. isolate DA5.1 (OP270482). No sample was positive for protozoa of the genus *Hepatozoon* spp.

In the phylogenetic reconstruction, the studied samples that showed identity with *Babesia* were in the same clade as other babesiae not determined at a specific level, including a new species of *Babesia* associated with *D. albiventris* (identified in a blood sample from this mammal- MW290046, MW290048 and MW290049; and in the ectoparasite *Amblyomma dubitatum*- MW342734) in Brasília and Mato Grosso do Sul/Brazil (Figure 2). The samples detected infected with ehrlichia, samples 66 and 111, formed a clade with other ehrlichia not defined at a specific level, called *Ehrlichia* sp. strain Natal. (KY207546) (Figure 3).

3 DISCUSSION

The values of the hematological parameters found in the blood counts differ from those cited in the literature (Casagrande *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Tarragona *et al.*, 2011; Moreira 2013; Nascimento and Horta, 2014; Teixeira 2021). These differences may reflect differences in the methodologies applied, geographical variations, biological factors intrinsic to the species and/or laboratory techniques used. The results of the hematological values found in this study may help veterinarians in the medicine of opossums, as it contributes to increasing information about these marsupial species.

The absence of infective forms in the blood smear slides is an expected result and corroborates what has been mentioned by other authors, since the parasitological test has low sensitivity due to the fact that babesiosis and hepatozoonosis are chronic diseases with intermittent parasitemia (Baneth *et al.*, 1998; O'Dwyer *et al.*, 2001; Brandão and Hagiwara, 2002; Silva *et al.*, 2011; Braga and Silva, 2013; Soares, 2015; Dias and Ferreira, 2016; Perles, 2019; Pereira *et al.*, 2021; Bittencourt *et al.*, 2022).

Although morulae compatible with *Ehrlichia* spp. were observed in a blood smear, corresponding to sample 28, there was no molecular detection and the alterations found in the blood count suggest macrocytic hypochromic anemia, thrombocytopenia, dehydration and possible signs of an inflammatory and/or infectious process.

In Brazil, the detection of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp. in opossums has been reported in other studies (Melo *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2018; Colle *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.* 2021; André *et al.*, 2022; Weck, 2022).

The serological diagnosis of *Ehrlichia canis* in *D. albiventris* and *D. aurita* in municipalities in the state of São Paulo was reported by Melo *et al.* (2016). Silva *et al.* (2017) described the parasitological and molecular diagnosis of *Hepatozoon* spp. in samples of white-eared opossums (*D. albiventris*) from the Botucatu region, a result that differs from our work, in which we investigated the same pathogen, in the same host and in the same region, but did not obtain positive results. In a study conducted by Soares *et al.* (2017) in the Brazilian Amazon region, the presence of *Babesia* spp. was molecularly detected in *D. marsupialis*. However, the study did not detect the presence of *Hepatozoon* spp. In an analysis of rodent, marsupial and carnivore samples from the Pantanal, Souza *et al.* (2017) morphologically detected the presence of *Hepatozoon* spp. in *D. albiventris*. In a study involving rodents and marsupials in the Brazilian Amazon, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. were detected parasitizing *D. marsupialis* (Colle *et al.*, 2019). In a study conducted by Guimarães *et al.* (2019) in Rio de Janeiro, there was the molecular detection of “a new genotype of *Ehrlichia* sp. closely related to genotypes of *E. canis* previously reported in dogs in Brazil”, in *Didelphis aurita*. Weck (2022) reported that in a study performed with rodents and marsupials in the Cerrado and the Atlantic Forest, the presence of *Hepatozoon* spp. was molecularly detected in an individual of the species *D.*

aurita from Mato Grosso do Sul, but neither *Babesia* spp. nor *Ehrlichia* spp. were detected.

Through phylogenetic analysis, it was possible to confirm that the five samples positive for *Babesia* sp. in this study are related to *Babesia* sp. detected by Gonçalves *et al.* (2021) in a study carried out in two Cerrado locations, Brasília and Campo Grande, with populations of *Didelphis albiventris* and ectoparasites found in these animals.

According to the study by Lopes *et al.* (2018), a new strain of *Ehrlichia* was identified parasitizing *Didelphis albiventris* in the state of Rio Grande do Norte and was named *Ehrlichia* sp. strain Natal. Tarragona (2022) detected the presence of the same Natal strain in *Didelphis albiventris* in the province of Formosa, Argentina, marking the first report of this parasitism in the country. Phylogenetic analysis confirmed that the two *Ehrlichia*-positive samples detected in this study are related to the *Ehrlichia* sp. Natal strain described by Lopes *et al.* (2018). This finding suggests that this pathogen may have a wider geographical reach than initially thought, as well as highlighting the negative influence of anthropogenic actions on the emergence of new infectious agents, given that the studies were conducted in degraded areas of the Atlantic Forest (Carvalho *et al.*, 2020).

4 CONCLUSION

In conclusion, our study provides important information on vector-borne agents in opossums in the southeastern region of Brazil. This is the first study to report the molecular diagnosis of *Babesia* sp. and *Ehrlichia* sp. in free-living *Didelphis albiventris* in the municipality of Botucatu, São Paulo, Brazil. In addition, new hematological parameter values were established for the *D. albiventris* and *D. aurita* species. These results highlight the need for further studies to deepen our knowledge of the occurrence and distribution of pathogens in the wild, as well as to deepen our understanding of these marsupial species.

ETHICAL CONSIDERATION

All the procedures carried out in this study were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) under protocols 0237/2022 and 0055/2021 and were authorized by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) under numbers 84319-1 and 78287-1.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to the Postgraduate Program in Wild Animals at the Faculty of Veterinary Medicine of the São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu/São Paulo; Municipal Zoological Park “Quinzinho de Barros” (PZMQB), Sorocaba/São Paulo; Wildlife Management and Conservation Center (CeMaCAS), São Paulo; Environmental Health Surveillance (VAS), Botucatu/São Paulo; Animal Genetics Laboratory of the Chemical and Biological Sciences Department of the Botucatu Biosciences Institute, UNESP, Botucatu/São Paulo; To Paula Sader, Ticiania Zwarg and the team at the Wildlife Studies Laboratory for conducting the blood counts; To Rodrigo Bonifácio and Gabriela Ingegneri for their assistance in analyzing the statistical data of the blood counts; Laboratory of Ticks and Other Apterous Arthropods, Collection of Apterous Arthropod Vector of Community Health Importance – Oswaldo Cruz Institute/Rio de Janeiro; To João Pedro Siqueira Palmer for generously providing the positive controls for *Babesia* and *Hepatozoon*; to Genomic Platform DNA Sequencing (PDTIS, Oswaldo Cruz Foundation) for support with sample sequencing; To Karla

Bitencourt for performing the analysis of the genetic sequencing data and constructing the phylogeny.

FUNDING

This work was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aguiar, D. M. Erliquiose. In: Jericó, M. M. (Org.). Tratado de medicina interna de cães e gatos. 1^a. ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 83, p. 2329-2346, 2015.
- Almeida, A. P. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em cachorro-do-mato (*Cercopithecus thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 88, 2012.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, oct, 1990.
- Alves, T. S. Ocorrência de *Hepatozoon* spp., Piroplasmas, *Ehrlichia* spp. e filariídeos em mamíferos silvestres de Centros de triagem de Minas Gerais e Goiás. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, p. 103, 2017.
- Armando, C. Erliquiose canina: Revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biologia Animal: Animais de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, p. 30, 2022.
- André, M.R., Calchi, A.C., Perles, L., Gonçalves, L.R., Uccella, L., Lemes, J. R. B., Nantes, W.A.G, Santos, F.M, Oliveira, G.E.P., Barros-Battesti, D.M., Herrera, H.M., Machado, R. Z., 2022. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 13, n. 6, 2022.
- Ayala, S.C., D'Alessandro, A., Mackenzie, R., Angel, D. Hemoparasite infections in 830 wild animals from the eastern Llanos of Colombia. *The Journal of Parasitology*, v. 59, n. 1, p. 52-9, fev. 1973.
- Baneth, G., Shkap, V., Samish, M., Pipano, E., Savitsky, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 2- 4, p. 299-305, 1998.
- Baneth, G., Samish, M., Shkap, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *The Journal of Parasitology*, v. 93, n. 2, p. 283-299, 2007.
- Barros, J. H. S., Xavier, S. C. C., Bilac, D., Lima, V. S., Dario, M.A., Jasen, A. M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Tropica*, v. 172, p. 173–179, mai. 2017.
- Bezerra-Santos, M. A., Ramos, R. A. N., Campos, A. K., Dantas-Torres, F., Otranto, D. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*, v. 120, n. 12, p. 4091-4111, dec. 2021.
- Bittencourt, J., Hiura, E., Sobral, A.S., Vieira, F.T., Braga, F.R., Tobias, F.L., Aguiar, D. M., Langoni, H. Ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*

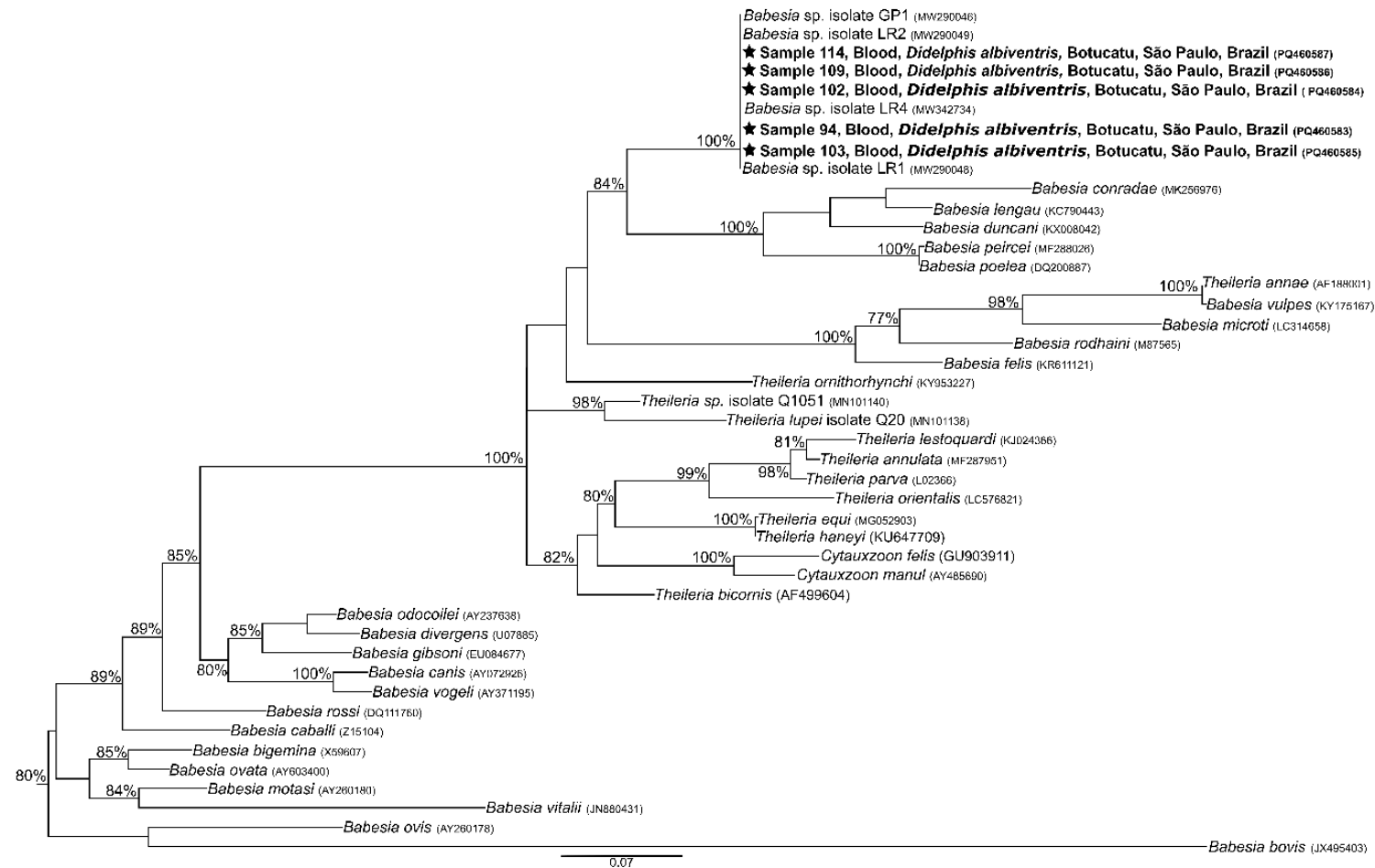
- em cães domiciliados, em dois municípios do estado do Espírito Santo – Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v. 29, p. 1-9. 2022.
- Bouza-Mora L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J.; Salazar-Sánchez, L.; Labruna, M. B.; Aguiar, A. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 1, p. 36-40, 2016.
- Braga, J. F. V., Silva, S. M. M. S., Babesiose canina: uma visão geral da doença. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 12, n. 2, p. 204-213, 2013.
- Brandão, L. P., Hagiwara, M. K. Babesiose canina - Revisão. *Revista Clínica Veterinária*, v. 7, n. 41, p. 50-59, nov./dez. 2002.
- Carneiro, A.S., Teixeira, M.N., Rêgo, E.W., Oliveira, J.B. Parâmetros hematológicos de *Didelphis albiventris* (Linnaeus, 1847) de vida livre provenientes do município de Igarassú- Pernambuco- Brasil. *Medicina Veterinária*, v. 4, n. 2, p. 9-15. 2010.
- Carvalho, B. M., Perez, L. P., Oliveira, B. F. A., Jacobson, L. S. V., Horta, M. A., Hacon, S. D. Doenças transmitidas por vetores no Brasil: mudanças climáticas e cenários futuros de aquecimento global. *Sustainability in Debate*, v. 11, n. 3, p. 383-404, dez. 2020.
- Cavalcanti, A. S. A. Aspectos parasitológicos e laboratoriais da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros em diferentes sistemas de criação intensiva. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, p. 95, 2021.
- Casagrande, R. A., Cesar, M. O., Horta, M. C., Rossi, S., Teixeira, R. H., Matushima, E. R. Perfil hematológico de gambás *Didelphis aurita* e *D. albiventris* do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 2, p. 185-189, 2009.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 37, apr., 2009.
- Colle, A. C., Mendonça, R. F. B., Maia, M. O., Freitas, L. C., Witter, R., Marcili, A., Aguiar, D. M., Muñoz-Leal, S., Labruna, M. B., Rossi, R. V., Pacheco, R. C. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 28, n. 4, p. 592–604, out. 2019.
- Dias, V. A. C. M., Ferreira, F. L. A. Babesiose canina: Revisão. *Pubvet*, v. 10, n. 12, p. 886-888, dez., 2016.
- Doyle, C. K., Labruna, M. B., Breitschwerdt, E. B., Tang, Y., 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, oct., 2005.
- Gonçalves, L. R., Paludo, G., Bisol, T. B., Perles, L.; de Oliveira, L. B, de Oliveira, C. M., da Silva, T. M. V., Nantes, W. A. G., Duarte, M. A., Santos, F. M., Porfírio, G. E. de O., Hirano, L. Q. L., Herrera, H. M., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., André, M. R. Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). *Parasitology Research*, v. 120, n. 10, p. 3537-3546, 2021.
- Guimarães, A., Raimundo, J. M., da Silva, A. T., Carpintero, F. M., Pires, J. R., Benevenuto, J. L., Machado, R. Z., André, M. R., Baldani, C. D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from

- Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 28, n. 1, p. 140-144, jan.-mar., 2019.
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. das C., Roque, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. Parasites & Vectors, v. 11, n. 502, p. 1-25, 2018.
- Khasnis, A.A., Nettleman, M.D. Global warming and infectious disease. Archives of Medical Research, v. 36, n. 6, p. 689-96, nov-dec., 2005.
- Kubo, M., Uni, S., Agatsuma, T., Nagataki, M., Panciera, R.J., Tsubota, T., Nakamura, S., Sakai, H., Masegi, T., Yanai, T. *Hepatozoon ursi* n. sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). Parasitology International, v. 57, n. 3, p. 287-294, sep, 2008.
- 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, n. 2, p. 189-195, jan., 2007.
- Lemos, T. D., Cerqueira, A. M. F., Toma, H. K., Silva, A. V., Corrêa, R. G. B., Paludo, G. R., Massard, C. L., Almosny, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 21, n. 2, p. 137-142, abr.-jun. 2012.
- Lopes, M.G., Muñoz-Leal, S., de Lima, J.T.R., Fournier, G.F.D.S.R., Acosta, I.D.C.L., Martins, T.F., Ramirez, D.G., Gennari, S.M., Labruna, M.B. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic Forest remnants in northeastern Brazil. International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife. v. 7, n. 3, p. 380-385, oct, 2018.
- Lopes, W. D. Z., Martins, J. R. de S., Costa, A. J., Soares, V. E., Teixeira, W. F., Cruz, B. C., Maciel, W., Felippelli, G., Carvalho, R. S. Aspectos da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos experimentalmente infectados. Veterinária e Zootecnia, v. 23, n. 2, p. 272-284, 2022.
- Macedo, L. P. F., Lima, M. F. Erlichiose canina: uma revisão de literatura. Revista Científica Mais Pontal, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2023.
- Maia, J.P., Crottini, A., Harris, D.J. Microscopic and molecular characterization of *Hepatozoon domerguei* (Apicomplexa) and *Foleyella furcata* (Nematoda) in wild endemic reptiles from Madagascar. Parasite v. 21, n. 47, p. 1-14, 2014.
- Melo, A. L. T., Aguiar, D. M. D., Spolidorio, M. G., Yoshinari, N. H., Matushima, E. R., Labruna, M. B., Horta, M. C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 25, n. 3, p. 348-352, 2016.
- Mendoza-Roldan, J.A., Ribeiro, S.R., Castilho-Onofrio, V., Marcili, A., Simonato, B.B., Latrofa, M.S., Benelli, G., Otranto, D., Barros-Battesti, D.M. Molecular detection of vector-borne agents in ectoparasites and reptiles from Brazil. Ticks Tick Borne Diseases, v. 12, n.1, p. 1-9, oct, 2021.
- Moreira, Silvia Bahadian. Aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) da Serra dos Órgãos, RJ. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 132, 2013.
- Nascimento, C. C., Horta, M. C. Didelphimorphia (Gambá e Cuíca). In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., Catão-Dias, J. L. (org.). Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. 2ª ed. São Paulo: Roca, p. 761-788, 2014.

- O'Dwyer, L.H., Massard, C.L., Pereira de Souza, J.C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 3, p.143-150. jan., 2001.
- Olicheski, Adriana Tarnowski. Comparação entre os métodos de coloração panóptico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de Riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 87, 2003.
- Pereira, B. L. A. R., Sorte, E. C. B., Borges, J. C., Mendonça, A. J. Ocorrência de *Babesia* spp. em cães utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. 1-8, feb., 2021.
- Perles, Livia. Diversidade genética de *Hepatozoon* spp. em roedores no Brasil. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, p. 89, 2019.
- Rabelo, Fernanda Almeida. Doenças transmitidas por vetores em canídeos na região da Serra do Amolar, Pantanal, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, p. 56, 2014.
- Ramos, C. A. N., Ramos, R. A. N., Araújo, F. R., Guedes Jr., D. S., Souza, I. I. F., Ono, T. M., Vieira, A. S., Pimentel, D. S., Rosas, E. O., Faustino, M. A. G., Alves, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 1, p. 58–62, dez. 2009.
- Roque, A.L.R.; Jansen, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.
- Rossi, R. V., Bianconi, G. V., Pedro, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: Reis, N. R., Peracchi, A.L., Pedro, W. A., Lima, I. P. Mamíferos do Brasil. Londrina: UEL, p. 27-66, 2006.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Silva, J. R., Meirelles, G. P., Zavilenski, R. B., Gravinatti, M. L., Silva, J. P. M., Bertéli, M. B. D., Martins, R. R., Ribeiro, M. G., Ribeiro, L. V. P. Avaliação do perfil renal de equinos submetidos ao tratamento com dipropionato de imidocarb. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 9, n.1, p. 57-58, 2011.
- Silva, M. R. L., Fornazari, F., Demoner, L. C., Teixeira, C. R., Langoni, H., O'Dwyer, L. H. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Disease*. v. 8, n. 6, p. 878-881. oct. 2017.
- Smith, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 565-85, aug.,1996.
- 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. Tese (Doutorado em Reumatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 86, 2009.
- Soares, J. F. Piroplasmoses. In: Jericó, Márcia Marques (Org.). *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 2277-2317, 2015.
- Soares, H.S., Marcili, A., Barbieri, A.R., Minervino, A.H., Moreira, T.R., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the

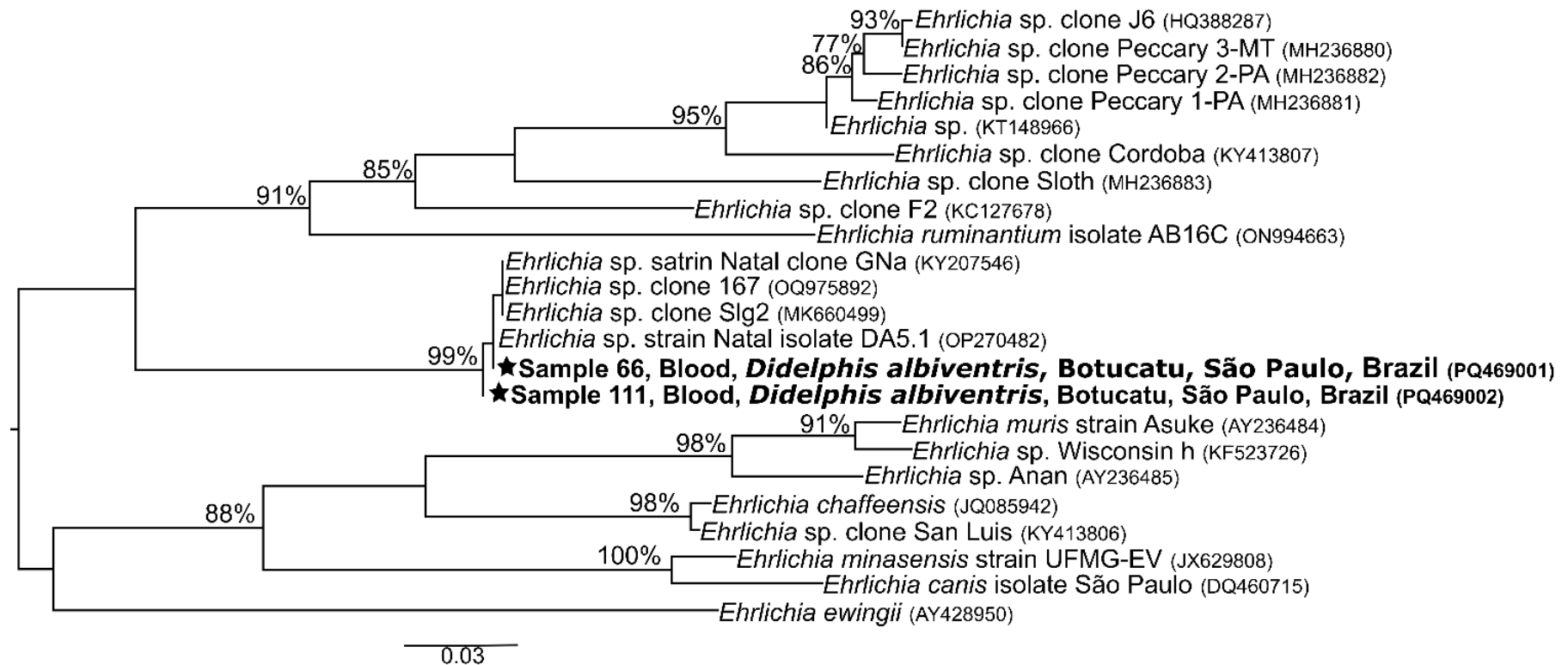
- wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 6, n. 2, p.115-121, 2017.
- Sousa, K.C., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Benevenuto, J.L., Santos, F.M., Rocha, F.L., Barreto, W.T., Macedo, G.C., Campos, J.B., Martins, T.F., Andrade Pinto, P.C., Battesti, D.B., Piranda, E.M., Cançado, P.H., Machado, R.Z., André, M.R. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. *Veterinary Parasitology*, v. 15, n. 237, p. 37-46, apr., 2017.
- Taques, I. I. G. G. Análise clínico-patológica e soroepidemiológica pelo uso de peptídeos sintéticos de proteínas TRP de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* no Brasil. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p.77, 2020.
- Tarragona, E.L., Flores, F.S., Lamattina, D., Torrents, J., Sebastian, P.S., Nava, S. Two novel *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains detected in ticks (Ixodida, Ixodidae) and opossums (Didelphimorphia: Didelphidae) in Argentina. *Ticks Tick-Borne Diseases*, v. 13, n. 6, p. 102043, nov., 2022.
- Tarragona, E.L.; Zurvera, D.; Manzoli, D.E.; Correa, A.I.; Delgado, A.R.; Mastropaolo, M.; Barengo, E.; Beldomenico, P.M. Parâmetros hematológicos de la comadreja overa, *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), de poblaciones silvestres del centro de la Argentina. *Investigación Veterinaria*, v. 13, n. 2, p. 97-105, dic., 2011.
- Teixeira, R. S. Investigação de *Borrelia* spp. e alterações hematológicas associadas em gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) de vida livre no estado do Rio Janeiro. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 59, 2021.
- Telford Junior, S. R. Three new *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. *The Journal of Parasitology*, v. 96, n. 1, p. 162–169, fev., 2010.
- Uilenberg, G. Babesia - A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v.138, n. 1-2, p. 3–10, may., 2006.
- Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. D. C., Nascimento, D. A. G., Tamekuni, K., Toledo, R. D. S., Chandrashekar, R., Marcondes, M., Biondo, A. W., Vidotto, O. Serosurvey of tickborne pathogens in dogs from urban and rural areas from Paraná State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 1, p. 104-109, jan-mar., 2013.
- Weck, B. C. Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, p.75, 2022.
- Zecca, I.B., Hodo, C.L., Slack, S., Auckland, L., Hamer, A.S. *Trypanosoma cruzi* infections and associated pathology in urban-dwelling Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. v. 10, n. 11, p. 287–293, mar., 2020.

Figure 2. Phylogeny, inferred by maximum likelihood analysis with evolution model T93+G, of partial sequences from DNA that encoded the RNAr 18S (735 base pairs) of piroplasmids containing sequences from *Babesia* sp. obtained from *Didelphis albiventris* blood samples collected from Botucatu, São Paulo/Brazil (highlighted with a star) in relation to piroplasmid sequences obtained from GenBank. The numbers on the branches represent support values (70% cut-off).



Source: Karla Bitencourt

Figure 3. Phylogeny, inferred by maximum likelihood analysis with evolution model T92+G, of partial sequences from the gene Disulfide Oxidoreductase (dsb) (353 base pairs) of *ehrlichia* obtained from *Didelphis albiventris* blood samples collected from Botucatu, São Paulo/Brazil (highlighted with a star) in relation to *ehrlichia* sequences obtained from GenBank. The numbers on the branches represent support values (70% cut-off).



Source: Karla Bitencourth

ANEXO

Anexo 1. Protocolo de Extração de DNA – sangue fenol/clorofórmio

1. Colocar o sangue (100 a 200 μ L) em um tubo de 2 mL, adicionar as soluções de digestão: 300 μ L de TNE 1x; 30 μ L TRIS HCl pH 8 a 1m; 0.8 μ L SDS 25%;
2. Adicionar 20 μ L de Proteinase K;
3. Deixar o tubo em banho seco em 37°C overnight (ou 55°C por duas horas);
4. Adicionar 338 μ L de fenol/clorofórmio isoamílico na proporção 25:24:1;
5. Levar ao vórtex por 15 segundos e centrifugar por 10 min a 12000 rpm;
6. Retirar sobrenadante e transferir para tubo limpo, adicionar dois volumes de etanol absoluto (observar a quantidade da amostra e multiplicar por 2. Inverter tubo até a precipitação do DNA;
7. Centrifugar por 30 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante;
8. Adicionar 500 μ L de etanol 70%. Centrifugar por 10 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante;
9. Deixar secar e eluir em H₂O ultrapura (60 a 80 μ L);
10. Armazenar a -20°C.

Anexo 2. Protocolos das Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR)

PCR convencional – *Babesia* spp.

REAGENTE	VOLUME	PERFIL TÉRMICO		
H ₂ O	18,05 uL	FASE	T° C	TEMPO
Buffer 10x	2,5 uL	Desnaturação	95 °C	5m
MgCl ₂	0,75 uL	inicial		
BAB143-167	0,5 uL	Desnaturação	95 °C	1m
BAB858-834	0,5 uL	Anelamento	64 °C	1m
dNTP	0,5 uL	Extensão	72 °C	1m
Plat.	0,2 uL	Extensão final	72 °C	5m
DNAg	2 uL			
VOLUME FINAL	25 uL			40 ciclos

PCR convencional – *Hepatozoon* spp.

REAGENTE	VOLUME	PERFIL TÉRMICO		
H ₂ O	18,05 uL	FASE	T° C	TEMPO
Buffer 10x	2,5 uL	Desnaturação	95 °C	5m
MgCl ₂	0,75 uL	inicial		
HEP forward	0,5 uL	Desnaturação	95 °C	30s
HEP reverse	0,5 uL	Anelamento	50 °C	30s
dNTP	0,5 uL	Extensão	72 °C	1m
Platinum	0,2 uL	Extensão final	72 °C	7m
DNAg	2 uL			
VOLUME FINAL	25 uL			35 ciclos

Nested-PCR – *Ehrlichia* spp.

REAGENTE	VOLUME
H ₂ O	18,05 uL
Buffer 10x	2,5 uL
MgCl ₂	0,75 uL
DSB-330F	0,5 uL
DSB-720R	0,5 uL
dNTP	0,5 uL
Platinum	0,2 uL
DNAg	2 uL
VOLUME FINAL	25 uL

PERFIL TÉRMICO – 1º round			
FASE	T° C	TEMPO	
Desnaturação inicial	95 °C	3m	
Desnaturação	95 °C	15s	35 ciclos
Anelamento	50 °C	30s	
Extensão	72 °C	30s	
Extensão final	72 °C	5m	

REAGENTE	VOLUME
H ₂ O	18,05 uL
Buffer 10x	2,5 uL
MgCl ₂	0,75 uL
DSB-330F	0,5 uL
DSB-720R	0,5 uL
dNTP	0,5 uL
Platinum	0,2 uL
Amplicon 1º ciclo	2 uL
VOLUME FINAL	25 uL

PERFIL TÉRMICO – 2º round			
FASE	T° C	TEMPO	
Desnaturação inicial	95 °C	3m	
Desnaturação	95 °C	15s	30 ciclos
Anelamento	52 °C	30s	
Extensão	72 °C	30s	
Extensão final	72 °C	5m	

