

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULARES DE AGENTES ANAPLASMATACEAE,  
MICOPLASMAS HEMOTRÓFICOS, PIROPLASMAS E  
*Hepatozoon* sp. EM CARNÍVOROS SELVAGENS  
MANTIDOS EM CATIVEIRO NO BRASIL**

**Marcos Rogério André**  
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Janeiro de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULARES DE AGENTES ANAPLASMATACEAE,  
MICOPLASMAS HEMOTRÓFICOS, PIROPLASMAS E  
*Hepatozoon* sp. EM CANÍDEOS E FELÍDEOS SELVAGENS  
MANTIDOS EM CATIVEIRO NO BRASIL**

**Marcos Rogério André**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Janeiro de 2012

André, Marcos Rogério  
A555d Detecção sorológica e caracterização moleculares de agentes  
Anaplasmataceae, micoplasmas hemotróficos, piroplasmas e  
*Hepatozoon* sp. em carnívoros selvagens mantidos em cativeiro no  
Brasil. – Jaboticabal, 2012  
xvi, 209 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Rosangela Zacarias Machado  
Banca examinadora: José Maurício Barbanti Duarte, Karin  
Werther, Nádia Regina Pereira Almosny, Natalino Hajime Yoshinari  
Bibliografia

1. carnívoros selvagens. 2. *Hepatozoon* sp. 3. micoplasmas  
hemotróficos. 4. piroplasmas. 5. Rickettsiales. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.616.993:639.11

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ** – solteiro, nascido na cidade de Sertãozinho, São Paulo, em 4 de fevereiro de 1982. É Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, em 2004. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq, trabalhando com pesquisas na área de Imunoparasitologia. Recebeu o “Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal”, por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o curso de Medicina Veterinária, “Prêmio Mário D’ Ápice”, outorgado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo, ao formando em Medicina Veterinária, melhor classificado no conjunto de disciplinas profissionalizantes e o “Prêmio Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo 1º Colocado no Curso de Medicina Veterinária 2004”. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal – SP, em março de 2006, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado com bolsa FAPESP. Mestre em Medicina Veterinária em fevereiro de 2008. Em março de 2008, ingressou no Curso de Doutorado em Medicina Veterinária (Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva) com bolsa concedida pela FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado. Entre julho de 2010 e fevereiro de 2011 realizou Estágio de Doutorado Sanduíche na Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, Estados Unidos, sob orientação do Prof. Dr. John Stephen Dumler, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **DEDICO**

**Aos meus queridos pais, João Mauro e Marli,**  
pelo amor, incentivo e apoio  
em todas as decisões na minha vida.  
Obrigado por tornar um sonho uma realidade!

## **OFEREÇO**

**Aos meus sobrinhos João Pedro e Valentina**  
pelo amor incondicional

*"A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria." (Will Durant)*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**À Professora Rosangela Zacarias Machado,**  
pelos ensinamentos, amizade, lições de entusiasmo  
e, acima de tudo, por ser responsável  
por semear a paixão pela ciência.

*“Não há dificuldade que não traga aprendizado, não há aprendizado sem mudanças e muito menos felicidade sem conquistas” (Fábio Lima)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e presença constante.

Aos meus pais, João Mauro André e Marli André, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Mauro Rodrigo André e Melina Daiane André, pelo companheirismo e apoio.

A todos os meus familiares pelo incentivo e palavras de apoio, em especial Helena P. André, Sônia Volpe, Tiago Mari Lopes da Silva, Celi André, José Carlos Volpe Júnior, Iago Volpe, Elaine André, Ana Paula André, Francisco André e Rosemeire Volpe.

Aos meus sobrinhos João Pedro L. da Silva e Valentina L. da Silva, pelo carinho.

Ao meu amigo-irmão, Arthur de Oliveira Galloro, pelo companheirismo, confiança e amizade.

À Professora Rosangela Zacarias Machado, pela orientação, oportunidade concedida e amizade durante todos os anos de graduação e pós-graduação.

Aos meus amigos Karina Peticarrari, Marco Antônio de Castro Nardelli, Gabriel Funichello, Henrique Bighetti, Eduardo Lopes, Eduardo Toniello, Thiago Menechelli, Lívia Pivetta, Amanda Bonini, Liz Maraucci, Luma Borelli, Gabriela Toniello Galon, Fernanda Toniello, Raíssa Magro, Alessandro Franzo, Marília Monteiro, Maria Eduarda Barbieri, Viviane Pinto, Gustavo S. Sanches, Vanessa Magro, Natália Sisdeli, Carolina Brustello, Lecyana Galloro, Virgínia Lopes, Tamiê Tsugi, Pedro Martelli, Pedro Nardelli, Murilo Mossin e a todos aqueles que compartilharam comigo os melhores momentos de minha vida e, muitas vezes, compreenderam momentos de ausência.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária: Andréa C. Higa Nakaghi, Ana Sílvia Dagnone, Trícia M. Oliveira, Patrícia I. Furuta, Ana Carolina Silveira, Tiago Mineo, Adriano Carrasco, Meire Seki, Cristiane Divan Baldani, Mayra Araguaia, Fernando Antônio Gavioli, Luiz Ricardo Gonçalves, Natasha Micelli, Keyla Carstens, Paulo Sampaio, Tamiris Tejerina, Giovanni Vargas, Maria do Socorro Braga, Arvelino Jacinto e Vivian Boter pela amizade, colaboração e ensinamentos durante o tempo de convivência no Laboratório.

Aos amigos Márcia Jusi, Carla Freschi e Rafaela Beraldo, pela convivência diária e amizade desenvolvida durante os anos de pós-graduação.

Ao Professor Aramis Augusto Pinto, pelos valiosos ensinamentos, amizade e palavras de incentivo.

Aos Professores John Stephen Dumler e Dennis Grab, da Johns Hopkins School of Medicine, pela oportunidade, ensinamentos e amizade.

À Diana G. Scorpio, pelo companheirismo em Baltimore e amizade.

Aos meus amigos da Johns Hopkins School of Medicine, especialmente à Meg Lichay, Sara Gilmore, Emily Clemens, Cindy Chen, Kristen Bankert e Olga Nikolskaia pela ajuda e bons momentos na Johns Hopkins.

Aos meus amigos de Baltimore, Valério Baraúna, Gabriela Scáta, Luiza Barros, Rogério Faustino, Diogo Cunha, Vanessa Lindholz, Michelle, Viviane Cáceres e Michelle Zaleski pelos bons momentos em Baltimore.

À Marty King pela estadia em Baltimore.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, principalmente à Moema Ogassavara.

À Professora Silmara M. Allegretti, pela parceria, apoio e amizade.

Aos amigos Mariluce Nepomuceno, Maria Letícia Meloni, Lucas Zena, Rodrigo Savegnago, Natália Meloni e Rodrigo Milan pela companhia nas viagens diárias de Sertãozinho a Jaboticabal.

Aos meus cães Capitu, Toquinho, Lilica e Huguinho pelo companheirismo diário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado (Processo 07/59889-6) e Auxílio-pesquisa (Processo 08/55570-8) concedidos para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela concessão de licença de colheita e transporte de material biológico.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, especialmente à Moema Ogassavara.

À direção e funcionários da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Zoológico Municipal Bosque dos Jequitibás de Campinas, Bosque/Zoológico Municipal de Pedreira, Bosque Municipal Fábio Barreto de Ribeirão Preto e Zoológicos de

Cuiabá, Brasília, Itatiba, Bauru, Sorocaba, Americana, Ilha Solteira, São Carlos, Nova Odessa, Catanduva, Mogi Mirim e Piracicaba.

À coordenação, equipe de funcionários e estagiários da Associação Mata Ciliar de Jundiaí, e em especial, Cristina H. Adania.

Aos Professores membros da banca de Doutorado, Natalino Yoshinari, José Maurício Barbanti Duarte, Karin Werther e Nádía Almosny pelas sugestões e contribuição para melhoria do trabalho.

*"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos." (Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xv
SUMMARY .....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
III. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos.....	42
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo.....	44
4.2. Colheita das amostras.....	46
4.2.1. Imobilizações química e física.....	46
4.2.2. Obtenção das amostras de sangue e soro.....	46
4.3. Confeção de esfregaços sanguíneos.....	47
4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	47
4.4.1. Reação de Imunofluorescência Indireta para agentes Anaplasmataceae.....	47
4.4.1.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>E. canis</i> .....	47
4.4.1.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Neorickettsia risticii</i> .....	48
4.4.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i> ....	48
4.4.2.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>Babesia canis vogeli</i> .....	48
4.4.2.1. Descrição da Reação.....	50
4.5. Detecção de anticorpos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e do antígeno p27 de FeLV (vírus da leucemia felina).....	50
4.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	51
4.6.1. Extração de DNA.....	51
4.6.2. Reações de Amplificação para agentes da Ordem Rickettsiales.....	51
4.6.2.1. Reações de Amplificação para agentes da Família Anaplasmataceae baseada no gene <i>16S rRNA</i> .....	51
4.6.2.2. Reação de Amplificação do tipo nested PCR para <i>Ehrlichia sp.</i> baseada no gene <i>omp-1</i> .....	55
4.6.2.3. Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia sp.</i> baseada no gene dissulfito oxidoreductase ( <i>dsb</i> ).....	55

	<b>Página</b>
4.6.2.4. Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. baseada no gene <i>ftsZ</i> .....	56
4.6.2.5. Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. baseada no gene da $\beta$ -subunidade da RNA polimerase ( <i>rpoB</i> ).....	56
4.6.2.6. Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. baseada no gene citrato sintase ( <i>gltA</i> ).....	57
4.6.2.7. Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. baseada no gene <i>groESL</i> (“heat shock operon”).....	57
4.6.2.8. Reação de Amplificação para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseada no gene <i>msp-2</i> .....	58
4.6.2.9. Reação de Amplificação para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseada no gene <i>ankA</i> .....	59
4.6.2.10. Padronização de uma Multiplex PCR para amplificação de DNA de <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Bartonella</i> spp.....	59
4.6.2.10.1. Seleção de genes-alvo.....	59
4.6.2.10.2. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise .....	60
4.6.2.10.3. Teste de especificidade de oligonucleotídeos iniciadores .....	60
4.6.2.10.4. Teste de especificidade das sondas de hidrólise.....	61
4.6.2.10.5. Aquisição de sequências não disponíveis no GenBank.....	61
4.6.2.10.6. Teste de sensibilidade dos ensaios “singleplex” e multiplex.....	61
4.6.2.11. PCR em tempo real para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> baseada no gene <i>vIpt</i> .....	62
4.6.2.12. PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseada no gene <i>msp-2</i> .....	63
4.6.2.13. PCR multiplex em tempo real para riquetsias do “Grupo da Febre Maculosa” e do “Grupo do Tifo” e <i>Orientia tsutsugamushi</i> .....	63
4.6.3. Reações de Amplificação para hemoplasmas.....	64
4.6.3.1. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma haemofelis</i> / <i>M. haemocanis</i> e <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> / <i>M. haematoparvum</i> baseada no gene <i>16S rRNA</i> .....	64
4.6.3.2. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma haemofelis</i> e <i>M. haemocanis</i> baseada no gene <i>16S rRNA</i> .....	65
4.6.3.3. Reação de Amplificação para <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> e <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> baseada no gene <i>16S rRNA</i> .....	65
4.6.3.4. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma turicensis</i> baseada no gene <i>16S rRNA</i> .....	66
4.6.3.5. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma</i> sp. baseada no gene <i>16S rRNA</i> (fragmento de 600 pb).....	67
4.6.3.6. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma</i> sp. baseada no gene <i>16S rRNA</i> (fragmento de 1475 pb).....	67
4.6.3.7. Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma</i> sp. baseada no gene <i>mpB</i> .....	68

	<b>Página</b>
4.6.4. Reações de Amplificação para piroplasmas.....	68
4.6.4.1. Reação de Amplificação para <i>Babesia</i> sp. (gene <i>18S rRNA</i> ).....	68
4.6.4.2. Reação de Amplificação do tipo nested PCR para <i>Babesia</i> sp. (gene <i>18S rRNA</i> ).....	69
4.6.4.3. Reação de Amplificação do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Babesia</i> sp.....	69
4.6.4.4. Reação de Amplificação do gene da $\beta$ - <i>tubulina</i> de <i>Babesia</i> sp.....	70
4.6.4.5. Reação de Amplificação para <i>Cytauxzoon</i> sp. baseada no gene <i>18SrRNA</i> .....	70
4.6.4.6. Reação de Amplificação para <i>Cytauxzoon</i> sp. baseada nas regiões intergênicas 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) .....	71
4.6.7. Reações de Amplificação para <i>Hepatozoon</i> spp.....	72
4.6.7.1. Reação de Amplificação para <i>Hepatozoon</i> sp. (fragmento de 650pb do gene <i>18S rRNA</i> ).....	72
4.6.7.2. Reação de Amplificação para <i>Hepatozoon</i> sp. (fragmento de 1750pb do gene <i>18S rRNA</i> ).....	72
4.6.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	73
4.7. Reações de Clonagem e Seqüenciamento.....	73
4.7.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose.....	73
4.7.2. Quantificação de DNA dos amplímeros.....	73
4.7.3. Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy	74
4.7.4. Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH10B .	75
4.7.5. Mini-preparação de DNA Plasmidial.....	75
4.7.6. Seqüenciamento.....	75
4.7.7. Análise das Seqüências.....	76
V. RESULTADOS.....	78
5.1. Esfregaços sanguíneos .....	78
5.2. Ectoparasitas .....	79
5.3. Sorologia e PCR para <i>E. canis</i> .....	79
5.4. Sorologia e PCR para <i>E. chaffeensis</i> .....	82
5.5. Sorologia e PCR para <i>Anaplasma</i> sp. ....	84
5.6. Sorologia e PCR para <i>Neorickettsia risticii</i> .....	86
5.7. PCR para <i>E. ewingii</i> , <i>Anaplasma platys</i> e <i>N. helminthoeca</i> .....	86
5.8. PCR multiplex para os gêneros <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> e <i>Bartonella</i> .....	87
5.8.1. Especificidade.....	87
5.8.2. Sensibilidade.....	88
5.8.3. Resultados da PCR multiplex em tempo real das amostras de canídeos e felídeos para <i>Ehrlichia</i> sp., <i>Anaplasma</i> sp. e <i>Bartonella</i> sp.....	88
5.9. Resultados da PCR em tempo real das amostras de canídeos e felídeos para <i>E. chaffeensis</i> ( <i>vlpt</i> ), <i>A. phagocytophilum</i> ( <i>msh-2</i> ), <i>Rickettsia</i> spp. e <i>Orientia tsutsugamushi</i> .....	89
5.10. PCR para <i>Mycoplasma</i> sp.....	89
5.11. Sorologia e PCR para <i>Babesia</i> sp.....	93

	<b>Página</b>
5.12. PCR para <i>Cytauxzoon</i> sp.....	<b>95</b>
5.13. PCR para <i>Hepatozoon</i> sp.....	<b>98</b>
5.14. Análise da similaridade das sequências pelo BLAST.....	<b>100</b>
5.14.1. Análise das sequências de <i>Ehrlichia</i> sp.....	<b>100</b>
5.14.2. Análise das sequências de <i>Anaplasma</i> sp.....	<b>101</b>
5.14.3. Análise das sequências de <i>Mycoplasma</i> sp.....	<b>102</b>
5.14.4. Análise das sequências de <i>Babesia</i> sp.....	<b>103</b>
5.14.5. Análise das sequências de <i>Cytauxzoon</i> sp.....	<b>104</b>
5.14.6. Análise das sequências de <i>Hepatozoon</i> sp.....	<b>104</b>
5.15. Filogenia.....	<b>105</b>
5.16. Detecção de anticorpos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e do antígeno p27 de FeLV (vírus da leucemia felina).....	<b>119</b>
5.17. Co-positividade na PCR.....	<b>119</b>
VI. DISCUSSÃO.....	<b>120</b>
VII. CONCLUSÃO.....	<b>140</b>
VIII. REFERÊNCIAS.....	<b>142</b>

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1</b>	Número, espécies e respectivas instituições de origem dos canídeos e felídeos selvagens amostrados.....	45
<b>Tabela 2</b>	Dosagens anestésicas utilizadas para a imobilização química de felídeos e canídeos selvagens mantidos em cativeiro.....	46
<b>Tabela 3</b>	Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e nested PCR, tamanhos dos amplicómeros e referências utilizadas para detecção molecular de agentes da Família Anaplasmataceae baseadas no gene <i>16S rRNA</i> .....	53
<b>Tabela 4</b>	Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR e nested PCR para agentes da Família Anaplasmataceae baseadas no gene <i>16S rRNA</i> .....	54
<b>Tabela 5</b>	Plasmídeos utilizados para avaliar a sensibilidade da PCR multiplex para os gêneros <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> e <i>Bartonella</i> .....	62
<b>Tabela 6</b>	Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (sondas de hidrólise TaqMan) utilizados na PCR multiplex em tempo real para amplificação de <i>Rickettsia</i> spp. (Grupos da Febre Maculosa e Tifo) e <i>Orientia tsutsugamushi</i> .....	64
<b>Tabela 7</b>	Resultados da sorologia e PCR convencional para <i>Ehrlichia</i> sp. de acordo com as espécies de carnívoros selvagens amostradas.....	84
<b>Tabela 8</b>	Resultados da sorologia e PCR convencional para <i>Anaplasma</i> sp. de acordo com as espécies de carnívoros selvagens amostradas..	86
<b>Tabela 9</b>	Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados na PCR multiplex em tempo real para os gêneros <i>Ehrlichia</i> sp., <i>Anaplasma</i> sp. e <i>Bartonella</i> sp.....	87
<b>Tabela 10</b>	Características da PCR “singleplex” e multiplex para os gêneros <i>Ehrlichia</i> sp., <i>Anaplasma</i> sp. e <i>Bartonella</i> sp.....	88
<b>Tabela 11</b>	Títulos de anticorpos anti- <i>B. canis vogeli</i> em canídeos e felídeos selvagens amostrados mantidos em cativeiro.....	94
<b>Tabela 12</b>	Correlação entre os resultados da PCR para <i>Cytauxzoon</i> sp. (baseada no gene <i>18S rRNA</i> ) e sorologia para <i>B. canis vogeli</i> para os felídeos selvagens em cativeiro amostrados.....	97

	<b>Página</b>
<b>Tabela 13</b> Máxima similaridade de amplicons obtida pelo BLAST® para amostras positivas nas PCRs para agentes Anaplasmataceae.....	<b>102</b>
<b>Tabela 14</b> Identidade verificada pelo programa BLAST® para as amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas para <i>Mycoplasma</i> sp.....	<b>103</b>
<b>Tabela 15</b> Identidade verificada pelo programa BLAST® para as amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas na PCR para <i>Hepatozoon</i> sp. ....	<b>104</b>
<b>Tabela 16</b> Co-infecção por hemoparasitas nas amostras de sangue de canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro associada à exposição a agentes retrovirais.....	<b>119</b>

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®).....	<b>74</b>
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia evidenciando gametócito de <i>Hepatozoon</i> sp. em neutrófilo presente em esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa de um gato-do-mato-pequeno da AMC, Jundiaí, SP (Aumento de 1000x). .....	<b>78</b>
<b>Figura 3</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>E. canis</i> obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN5/HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 2 até 3: amostradas de jaguatirica positivas; Canaleta 4: gato-maracajá negativo; Canaleta 5 até 6: amostras positivas de jaguatirica; Canaleta 7 até 8: amostras positivas de gato-do-mato-pequeno; Canaleta 9: amostra positiva de puma; Canaleta 10: branco; Canaleta 11: amostra positiva de onça-pintada .....	<b>80</b>
<b>Figura 4</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>Ehrlichia</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores conP28-F2/conP28-R2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 2: amostra positiva de onça-pintada (Zoológico de Pedreira); Canaletas 3 a 5: amostras de felídeos negativos; Canaleta 6: amostra positiva de jaguatirica (Jundiaí); Canaleta 7: amostra negativa de felídeo; Canaletas 8 e 9: amostras positivas de jaguatiricas (Jundiaí); Canaletas 10 a 15: amostras negativas de felídeos; Canaleta 16: branco (água ultra-pura esterilizada) .....	<b>81</b>

	<b>Página</b>	
<b>Figura 5</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Ehrlichia</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330/dsb-728. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 7: amostra de canídeo selvagem positiva para <i>Ehrlichia</i> sp. pelo gene <i>dsb</i> ; Demais canaletas: amostras anteriormente positivas na nPCR para o o gene 16SrRNA e negativas na PCR para o gene <i>dsb</i> ; Canaleta 20: branco (água ultra-pura esterilizada) .....	<b>82</b>
<b>Figura 6</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>E. chaffeensis</i> obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CHAFF/GA1UR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2: amostra de gato-do-mato-pequeno positivo (Zoológico de Ilha Solteira); Canaleta 3: amostra de felídeo negativa; Canaleta 4: amostra de cachorro-do-mato positiva (Zoológico de Americana); Canaletas 5 a 10: amostras de felídeos negativas; Canaleta 11: amostra de suçuarana positiva (Zoológico de Sorocaba); Canaleta 12: amostra de felídeos negativa; Canaletas 13 e 14: amostras positivas de gatos-do-mato-pequeno (Zoológico de Sorocaba); Canaleta 15: branco (água ultra-pura esterilizada). ...	<b>83</b>
<b>Figura 7</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>Anaplasma</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE2/gE9f. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2 a 5: amostras de gatos-do-mato-pequeno positivas; Canaleta 6: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>85</b>

	<b>Página</b>	
<b>Figura 8</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gene <i>groESL</i> para as amostras positivas para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. pelo gene <i>16S rRNA</i> . Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo <i>E. canis</i> ; Canaletas 3 a 27: amostras positivas para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. pelo gene <i>16S rRNA</i> e negativas na PCR para o gene <i>groESL</i> ; Canaleta 28: amostra de canídeo selvagem positivo para <i>Anaplasma</i> sp. na nPCR para o gene <i>groESL</i> ; Canaleta 29: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>85</b>
<b>Figura 9</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Mycoplasma</i> sp. (gene <i>16S rRNA</i> ). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2 a 27: amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas; Canaleta 28: branco (água ultra pura esterilizada). .....	<b>90</b>
<b>Figura 10</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Mycoplasma haemofelis</i> / <i>M. haemocanis</i> (gene <i>16S rRNA</i> ). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 7: amostra de gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí positiva para <i>M. haemofelis</i> ; Demais canaletas: amostras de canídeos e felídeos selvagens negativas para <i>M. haemofelis</i> ; Canaleta 13: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>91</b>
<b>Figura 11</b>	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> / <i>M. haematoparvum</i> ( <i>16S rRNA</i> ). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ; Canaleta 2: amostra de gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí positiva para <i>M. haemominutum</i> ; Canaleta 3: amostra de lobo-europeu do Zoológico de São Paulo positiva para <i>M. haemominutum</i> ; Canaleta 4: amostra de felídeo selvagem negativa; Canaleta 5: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>91</b>

## Página

- Figura 12** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* (gene *16S rRNA*) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HBT-F e HBT-R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 e 2: amostras de felídeos selvagens positivas para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm); Canaletas 3, 17 e 21: amostras de felídeos positivas para CMhm, porém negativas na PCR em questão; Canaletas 4 a 16 e 18 a 20: amostras de felídeos selvagens positivas para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm); Canaleta 22: amostra de felídeo positiva para *M. haemofelis.*; Canaletas 23 e 24: amostras de canídeos positivas para *Mycoplasma sp.*; Canaletas 25 a 27: amostras de canídeos selvagens positivas para *Mycoplasma sp.*, porém negativas na PCR em questão; Canaleta 28: branco (água ultra-pura esterilizada). ..... 92
- Figura 13** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* baseada no gene *16S rRNA* que amplifica um fragmento de 1750 pb. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1, 3, 4, 5 e 6: amostras de felídeos positivas para *Mycoplasma sp.*; Canaleta 2: amostra negativa; Canaleta 7: água ultra-pura esterilizada. .... 92
- Figura 14** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* baseada no gene *rnpb*. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaleta 4: amostra positiva para o gene *rnpb*; Demais canaletas: amostras de felídeos e canídeos positivas para o *Mycoplasma sp.* baseada no gene *16S rRNA* e negativas na PCR baseada no gene *rnpb*. ..... 93

	<b>Página</b>
<b>Figura 15</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>Babesia</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores BTF2/BTR2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo <i>B. canis</i> ; Canaleta 2: amostra de gato-palheiro positivo; Canaleta 3: amostra de geneta postiva; Canaleta 4: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>94</b>
<b>Figura 16</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Babesia</i> sp (gene da $\beta$ - <i>tubulina</i> ) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Tubu-3 e Tubu-63F. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 1kb pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: amostra de sangue de gato-palheiro positiva para <i>Babesia</i> sp.; Canaleta 2: branco (água ultra-pura esterilizada); Canaleta 3: amostra de sangue de geneta positiva para <i>Babesia</i> sp. ....	<b>95</b>
<b>Figura 17</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Cytauxzoon</i> sp. (gene <i>18SrRNA</i> ). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 a 7: amostras de jaguatiricas positivas. Canaletas 8 e 9: amostras de suçuaranas positivas. Canaleta 10: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>96</b>
<b>Figura 18</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Cytauxzoon</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1-F; ITS1-R, ITS2-F e ITS-2R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 a 10: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene <i>18S rRNA</i> de <i>Cytauxzoon</i> sp. e também positivas na PCR para a região intergênica-1. Canaleta 11: branco: água ultra-pura esterilizada; Canaletas 12 a 19: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene <i>18S rRNA</i> de <i>Cytauxzoon</i> sp. e negativas na PCR para <i>Cytauxzoon</i> sp. baseada na região intergênica-2; Canaletas 20 e 21: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene <i>18SrRNA</i> de <i>Cytauxzoon</i> sp. e também positivas na PCR baseada na região intergênica-2; Canaleta 22: branco (água ultra-pura esterilizada). .....	<b>97</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 19</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Hepatozoon sp.</i> (gene <i>18S rRNA</i> ) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HEP-F e HEP-R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1: controle positivo ( <i>Hepatozoon canis</i> ); Canaleta 2: amostra positiva de um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Brasília; Canaletas 3 a 5: amostras positivas de gatos-do-mato-pequeno de Jundiaí; Canaleta 6: amostra negativa de felino; Canaleta 7: amostra positiva de gato mourisco do Zoológico de Ilha Solteira; Canaleta 8: amostra positiva de suçuarana do Zoológico de Sorocaba. Canaleta 9: branco (água ultra pura esterilizada). .....	<b>99</b>
<b>Figura 20</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para <i>Hepatozoon sp.</i> (gene <i>18S rRNA</i> ) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HAM-1 e HPF-2R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: branco; Canaletas 2 a 11: amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas para <i>Hepatozoon sp.</i> ; Canaleta 12: controle positivo ( <i>Hepatozoon canis</i> ). .....	<b>99</b>
<b>Figura 21</b> Posição filogenética de isolados de <i>Ehrlichia spp.</i> de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>16S rRNA</i> (350pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências se encontram entre parênteses. ....	<b>107</b>
<b>Figura 22</b> Posição filogenética de isolados de <i>Ehrlichia spp.</i> de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>omp-1</i> (309pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap (100 replicações). Os números de acesso das sequências se encontram entre parênteses. ....	<b>108</b>
<b>Figura 23</b> Posição filogenética de isolados de <i>Ehrlichia spp.</i> de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>dsb</i> (409pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências encontram-se entre parênteses. ....	<b>109</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 24</b> Posição filogenética de isolados de <i>Ehrlichia</i> spp. de canídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>groESL</i> (1297pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências encontram-se entre parênteses.....	<b>110</b>
<b>Figura 25</b> Posição filogenética de isolados de <i>Mycoplasma</i> spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>16S rRNA</i> (1475pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências estão indicados. ....	<b>111</b>
<b>Figura 26</b> Posição filogenética de isolados de <i>Mycoplasma</i> spp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>rnpB</i> (200pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências estão indicados. ....	<b>112</b>
<b>Figura 27</b> Posição filogenética de isolados de <i>Babesia</i> sp. de um gato-palheiro e uma geneta baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>18S rRNA</i> (900pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. ....	<b>113</b>
<b>Figura 28</b> Posição filogenética de isolados de <i>Babesia</i> sp. de um gato-palheiro e uma geneta baseada na análise de sequências de DNA do gene da <i>β-tubulina</i> (1198 pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. ....	<b>114</b>
<b>Figura 29</b> Posição filogenética de isolados de <i>Cytauxzoon</i> sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>18S rRNA</i> (651pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. ....	<b>115</b>
<b>Figura 30</b> Posição filogenética de isolados de <i>Cytauxzoon</i> sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do região de espaçamento intergênica 1 (ITS-1) (431pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. ....	<b>116</b>
<b>Figura 31</b> Posição filogenética de isolados de <i>Cytauxzoon</i> sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do região de espaçamento intergênica 2 (ITS-2) (800pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. ....	<b>117</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 32</b> Posição filogenética de isolados de <i>Hepatozoon</i> spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene <i>18S rRNA</i> (1750pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.	<b>118</b>

## DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULARES DE AGENTES ANAPLASMATACEAE, MICOPLASMAS HEMOTRÓFICOS, PIROPLASMAS E *Hepatozoon* sp. EM CARNÍVOROS SELVAGENS MANTIDOS EM CATIVEIRO NO BRASIL

**RESUMO** - Doenças transmitidas por vetores artrópodes são mundialmente importantes para a saúde humana e animal. Recentemente, diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar o possível papel dos animais selvagens na epidemiologia destas enfermidades. A identificação de reservatórios selvagens para estes hemoparasitas ajudaria no entendimento da epi enfermidades por eles causadas, principalmente aquelas de caráter zoonótico. O presente estudo teve como objetivo pesquisar em amostras de sangue de carnívoros selvagens mantidos em cativeiro a presença de infecção ou exposição a agentes Anaplasmataceae (*Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *N. helminthoeca*, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum*), *Rickettsiaceae* (*Orientia tsutsugamushi* e *Rickettsia* sp. dos Grupos da Febre Maculosa e do Tifo), *Babesia* sp., *Cytauxzoon* sp. (somente para os felídeos), micoplasmas hemotróficos (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Candidatus M. turicensis*, *M. haemocanis* e *Candidatus M. haematoparvum*) e *Hepatozoon* sp., utilizando métodos sorológicos e moleculares. Para tal, foram amostrados 167 felídeos e 100 canídeos selvagens mantidos em cativeiro nos estados de São Paulo, Mato Grosso e Distrito Federal. Doze felídeos (7,2%) e três (3%) canídeos mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *E. canis*. Apenas um canídeo (1%) mostrou-se soropositivo para *A. phagocytophilum*. Nenhum animal mostrou-se soropositivo para *E. chaffeensis* ou *N. risticii*. A análise filogenética baseada em um fragmento de 350 pb do gene *16S rRNA* não foi suficientemente robusta para diferenciar entre as espécies de *Ehrlichia* spp. Os fragmentos de DNA de *Ehrlichia* spp. encontrados em quatro felídeos foram posicionados em um ramo distinto daquela de *E. canis* e *E. chaffeensis*, com base na análise filogenética do gene *omp-1*. Ainda, a análise filogenética baseada no gene *dsb* confirmou a infecção por *E. canis* em uma cachorro-do-mato. Dezesete felídeos (10%) e 10 canídeos (10%) mostraram-se positivos para *Anaplasma* spp., o qual foi posicionado no mesmo ramo que *A. phagocytophilum* e *A. platys* na árvore filogenética baseada no gene *16S rRNA* e no mesmo ramo que *A. bovis* e *A. phagocytophilum* quando baseada no gene *groESL*. Vinte e sete (16%) carnívoros selvagens mostraram-se positivos para *Mycoplasma* spp. (*16S rRNA*): 22 felídeos para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, 1 para *M. haemofelis*, dois canídeos para *Candidatus M. haematoparvum* e dois para *Candidatus M. haemominutum*. Cinquenta e quatro felídeos (31%) e 10 canídeos (10%) mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *B. vogeli*. Um gato-palheiro e uma geneta mostraram-se positivos para *Babesia* sp., filogeneticamente relacionada a *Babesia leo* (98% de identidade pelo gene *18S rRNA*). Vinte e um felídeos (12,5%) foram positivos para *Cytauxzoon* sp. (98% de identidade com *C. felis* pelo gene *18S rRNA*). Seis canídeos e seis felídeos selvagens mostraram-se positivos para *Hepatozoon* sp. filogeneticamente distinto de outros isolados já conhecidos (com exceção de dois canídeos parasitados com *Hepatozoon* sp. filogeneticamente relacionado a *H. americanum* pelo gene *18S rRNA*). O presente trabalho mostra, portanto, a ocorrência de agentes transmitidos por artrópodes vetores em carnívoros selvagens no Brasil.

**Palavras-chave:** carnívoros selvagens, *Hepatozoon* sp., micoplasmas hemotróficos, piroplasmas, Rickettsiales

**SEROLOGICAL DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ANAPLASMATACEAE AGENTS, HEMOTROPHIC MYCOPLASMAS, PIROPLASMS, AND *Hepatozoon* sp. IN WILD CARNIVORES MAINTAINED IN CAPTIVITY IN BRAZIL**

**ABSTRACT** – Vector-borne diseases are worldwide important to human and animal health. Recently, several studies have been done aiming to investigate the role of wild animals in the epidemiology of these diseases. The identification of wild reservoirs for these hemoparasites would help in a better understanding of the epidemiology of these diseases, mainly that with zoonotic character. The present work aimed to investigate the presence of infection or exposure to Anaplasmataceae (*Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *N. helminthoeca*, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum*) and Rickettsiaceae (*Orientia tsutsugamushi* and Spotted Fever and Typhus Group *Rickettsia* sp.), *Babesia* sp., *Cytauxzoon* sp., hemotrophic hemoplasmas (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Candidatus M. turicensis*, *M. haemocanis* e *Candidatus M. haematoparvum*) and *Hepatozoon* sp. in captive wild carnivores blood samples by molecular and serological methods. Blood samples were collected from 167 wild felids and 100 wild canids, maintained in captivity in zoos from São Paulo and Mato Grosso states, and Distrito Federal. Twelve felids (7.2%) and three canids (3%) were seropositive to *E. canis*. Only one canid (1%) was seropositive to *A. phagocytophilum*. None was seropositive to *E. chaffeensis* neither *N. risticii*. The phylogenetic analysis of 350bp of 16S rRNA gene was not sufficiently robust to support the differentiation of *Ehrlichia* species. The *Ehrlichia* spp. DNA found in four felids was in a distinct clade from *E. chaffeensis* and *E. canis* by omp-1 phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis of *dsb* gene showed the infection by *E. canis* in one sampled crab-eating fox. Seventeen felids (10%) and ten canids (10%) was positive to *Anaplasma* spp. PCR, which was in the same clade than *A. phagocytophilum* and *A. platys* by 16S rRNA analysis, and in the same clade that *A. phagocytophilum* and *A. bovis* in *groESL* analysis. Twenty-seven (16%) wild carnivores were positive for *Mycoplasma* spp. DNA (16S rRNA): 22 wild felids for *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, one felid for *M. haemofelis*, two canids for *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, and two canids for *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Fifty-four felids (31%) and 10 canids (10%) were seropositive to *B. canis vogeli*. One pampas cat and one genet were positive to *Babesia* sp. PCR, closely related to *B. leo* (98% identity by 18S RNA gene). Twenty-one felids were positive to *Cytauxzoon* sp. (98% identity to *C. felis* by 18S rRNA). Six canids and six felids were positive to *Hepatozoon* sp., phylogenetically distinct from other *Hepatozoon* isolates (except two canids parasitized by *Hepatozoon* sp. closely related to *H. americanum* by 18S rRNA). The present work shows the occurrence of vector-borne agents in wild carnivores in Brazil.

**KeyWords:** hemotrophic mycoplasmas, *Hepatozoon* sp., piroplasmas, Rickettsiales, wild carnivores

## I. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores artrópodes são mundialmente importantes para a saúde humana e animal. Diversos agentes infecciosos, hospedeiros e vetores estão envolvidos na epidemiologia destas enfermidades (HARRUS e BANETH, 2006). A emergência destas doenças representa novos desafios para a medicina humana e veterinária. Tais enfermidades estão ampliando sua distribuição geográfica, devido a mudanças climáticas e acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais. A presença de animais domésticos em ambientes selvagens tem resultado em uma associação cada vez mais íntima entre reservatórios selvagens e vetores com o homem e animais domésticos. Tais fatos associados com o advento da biologia molecular, em particular o uso da Reação em Cadeia pela Polimerase, propiciaram o reconhecimento de enfermidades transmitidas por artrópodes (SHAW et al., 2001).

Recentemente, diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar o papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças causadas por agentes Anaplasmataceae. A identificação de reservatórios selvagens para estes hemoparasitas ajudaria no entendimento da epidemiologia das enfermidades por eles causadas, principalmente aquelas de caráter zoonótico. Ainda que anticorpos anti-*Ehrlichia chaffeensis* tenham sido detectados em amostras de soro de cães e humanos no Estado de Minas Gerais (COSTA et al., 2006), o agente até o momento só foi detectado, por meio de métodos moleculares, em amostras de sangue de cervos-do-Pantanal (*Blastocercus dichotomus*) (MACHADO et al., 2006). Recentemente, anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram detectados em eqüinos no Estado de São Paulo (SALVAGNI et al., 2010), sendo que a presença deste agente foi também confirmada molecularmente em amostras de sangue de cães no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011) e aves carnívoras no Estado de São Paulo<sup>1</sup>. Esses achados ressaltam a necessidade de estudos mais aprofundados no que diz respeito à epidemiologia dos vetores, reservatórios e agentes envolvidos nestas enfermidades no Brasil, a fim de aumentar a efetividade do diagnóstico. A detecção molecular de *Neorickettsia risticii* em

---

<sup>1</sup> MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 2011.

eqüinos, trematódeos e moluscos no Rio Grande do Sul (COIMBRA et al., 2005; 2006) e de *Neorickettsia helminthoeca* em cães no Paraná (HEADLEY et al., 2006) colocam em evidência a existência de ciclos epidemiológicos complexos envolvendo agentes Anaplasmataceae e vetores não-artrópodes no Brasil. A recente detecção molecular de *Ehrlichia* spp. em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro em zoológicos do estado de São Paulo e Brasília abriu num novo campo de investigação a respeito de enfermidades transmitidas por carrapatos entre a fauna selvagem brasileira (ANDRÉ et al., 2010a).

No que diz respeito à piroplasmas transmitidos por carrapatos, é de real importância a caracterização molecular destes agentes entre os animais selvagens, em função da similaridade morfológica verificada entre os mesmos e o potencial risco de introdução destes agentes em zoológicos, tendo em vista o transporte, importação e transferência destes animais. A ocorrência de óbitos em leões devido à infecção por *Cytauxzoon* sp. em um zoológico no Estado do Rio de Janeiro (PEIXOTO et al., 2007), demonstra a necessidade de se diagnosticar este agente em outros felídeos selvagens, os quais poderiam atuar como reservatórios deste hemoparasita ou serem susceptíveis à infecção.

Protozoários do gênero *Hepatozoon* sp. diferenciam-se dos outros hemoparasitas uma vez que sua transmissão envolve a ingestão dos artrópodes vetores contendo oocistos. O significado primário da infecção por *Hepatozoon* sp. entre os carnívoros selvagens é desconhecido e sugere-se que tais animais possam atuar como reservatórios. No entanto, ainda é desconhecido se a doença é debilitante para estes animais e tampouco se aumenta a susceptibilidade dos mesmos a outras doenças.

Ainda que hemoplasmas venham sendo detectados em felídeos selvagens da África, América do Norte, Europa e América do Sul (Brasil), atuando como possíveis reservatórios destes agentes, os micoplasmas hemotróficos ainda não foram detectados em canídeos selvagens.

Embora as implicações da infecção por hemoparasitas sobre a conservação dos canídeos e felídeos selvagens sejam difíceis de serem estimadas, o presente trabalho mostra-se valioso uma vez que a maioria das espécies sob estudo encontra-se

atualmente ameaçada de extinção e, por este motivo, fazem parte de programas de reprodução em cativeiro no Brasil e no exterior.

Carnívoros podem atuar como sentinelas para agentes transmitidos por artrópodes, uma vez que podem ser hospedeiros tanto para os agentes patogênicos quanto para os carrapatos vetores, além de possuir maior atividade e dispersão que outros hospedeiros de carrapatos. Por conseguinte, a identificação de agentes transmitidos por artrópodes em carnívoros selvagens poderá contribuir no futuro para o estabelecimento de áreas de risco para as enfermidades transmitidas por artrópodes para o homem e animais domésticos.

Assim, o atual estudo propõe verificar se agentes transmitidos por artrópodes em animais domésticos circulam em populações de canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil. Desta forma, permitirá a identificação de patógenos que, por ventura, deverão ser investigados em procedimentos de translocação, quarentena, manutenção e monitoramento destes animais selvagens, auxiliando na adoção de medidas de caráter preventivo para doenças transmitidas por vetores artrópodes.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Infecções por agentes Anaplasmataceae

#### 2.1.1. Agentes etiológicos

Agentes Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, imóveis, intracelulares obrigatórias, cocóides a elipsoidais, residentes em fagossomos e que pertencem à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae*, subdivisão  $\alpha$  das Proteobactérias, que causam doenças no homem e animais (WALKER e DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003). São organismos que se mantêm na natureza por interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (DUMLER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003). Compreendem espécies filogeneticamente relacionadas, porém genética e antigenicamente diferentes (YU et al., 2006).

Dumler et al. (2001) propuseram uma reclassificação que divide os membros da ordem *Rickettsiales* em duas famílias: *Rickettsiaceae* (organismos intracitoplasmáticos pertencentes aos gêneros *Rickettsia* e *Orientia*) e *Anaplasmataceae* (organismos que ocupam vacúolos intracitoplasmáticos pertencentes aos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*). As espécies *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, o agente da HGE (Erliquiose Granulocítica Humana), *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia bovis* foram agrupadas no gênero *Anaplasma*; *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *Cowdria ruminantium* no gênero *Ehrlichia*; *E. sennetsu* e *E. risticii* no gênero *Neorickettsia*; e *Wolbachia pipientis* no gênero *Wolbachia*.

#### 2.1.2. Transmissão e Ciclo Biológico

A *E. canis*, agente mais comum e patogênico da erliquiose canina, infecta leucócitos mononucleares, formando inclusões citoplasmáticas, chamadas mórulas. Estas inclusões, de aspecto compacto, são formadas por agrupados de pequenas estruturas que variam de forma cocóide a elipsoidal (RISTIC e HUXSOLL, 1984). Dentro do monócito, o desenvolvimento das mórulas inicia-se num único corpúsculo elementar dentro do monócito, que se multiplica formando inclusões citoplasmáticas imaturas, denominados corpúsculos iniciais, os quais se desenvolvem após 7 a 12 dias

de incubação, formando as mórulas. Neste estágio, muitos monócitos estão três a quatro vezes maiores que o seu tamanho original (NYINDO et al., 1971).

O ciclo de desenvolvimento de *Ehrlichia sp* na célula hospedeira inicia-se com a adesão de pequenas células densamente coradas (CD), as quais acabam por penetrar na célula. Dentro de um vacúolo na célula hospedeira, as células-densas rapidamente se transformam em células reticuladas (CR), as quais se multiplicam por divisão binária por aproximadamente 48 horas e, então, após 72 horas de infecção, maturam e se transformam em células-densas novamente. Estas, por sua vez, são liberadas da célula hospedeira e recomeçam um novo ciclo de infecção (ZHANG et al., 2006).

Em cães, o principal mecanismo de transmissão natural é pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que, ao se alimentar, inocula a bactéria, juntamente com a saliva, nos animais susceptíveis (EWING, 1969). O carrapato se infecta ao ingerir sangue contendo a bactéria, que é capaz de se multiplicar nos hemócitos, nas células das glândulas salivares e do intestino (SMITH et al., 1976). A transmissão ocorre de forma transestadial e não transovariana (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976). Embora se acredite que a erliquiose felina seja transmitida por carrapatos, o vetor ainda não foi identificado.

*Ehrlichia chafeensis*, agente etiológico da erliquiose monocítica humana, tem como seus principais vetores os carrapatos *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes pacificus* (WALKER et al., 2008). É encontrada parasitando cervos-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), cães, coiotes e cabras nas regiões sudeste e central-sul dos EUA e Califórnia (WALKER et al., 2008). No Brasil foi detectada em cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) MACHADO et al., 2006) e aves carnívoras (MACHADO et al., 2012).

*Ehrlichia ewingii* é transmitida pela picada do carrapato *A. americanum*, sendo encontrada parasitando cervos-de-cauda-branca e cães nas regiões sudeste e central-sul dos EUA e Califórnia (WALKER et al., 2008).

*Anaplasma phagocytophilum*, agente etiológico da anaplasnose granulocítica humana, é transmitido pelo carrapato *Ixodes scapularis* na região norte dos EUA, tendo como principais hospedeiros o veado-de-cauda-branca, cães, eqüinos, esquilos e roedores. Na região da costa do Pacífico dos EUA, o agente é transmitido pelo

carrapato *Ixodes pacificus*, tendo como principais hospedeiros esquilos, roedores, eqüinos e alces. Na Europa, o carrapato *Ixodes ricinus* é o carrapato vetor do *A. phagocytophilum*, o qual pode ser encontrado em cervos, eqüinos, bovinos, gatos, ovelhas e roedores (WALKER et al., 2008). No Brasil, o agente foi detectado recentemente em cães no estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011) e aves carnívoras (MACHADO et al., 2012).

*Neorickettsia helminthoeca*, agente etiológico da doença do envenenamento pelo salmão, ocorre na região noroeste dos EUA e sul do Brasil (HEADLEY et al., 2011). Nos EUA, a doença é transmitida pela ingestão de salmão contendo metacercárias do trematódeo *Nanophytes salmincola* infectadas com *N. helminthoeca*. O caramujo *Oxytrema silicula* é o primeiro hospedeiro intermediário do trematódeo, onde ocorre os estágios de rédias e cercárias (HEADLEY et al., 2011).

*Neorickettsia risticii*, agente etiológico da Febre do Rio Potomac, é transmitida pela ingestão de insetos contendo metacercárias de um trematódeo infectado. Gibson et al. (2005) verificaram que o trematódeo *Acanthatrium oregonense* é o vetor e reservatório da *N. risticii*. Cercárias deste trematódeo são encontradas parasitando caramujos da família Pleuroceridae, larvas de insetos e intestinos de morcegos (GIBSON et al., 2005). No Brasil, Coimbra et al. (2006) detectaram *N. risticii* em eqüinos no Rio Grande do Sul, apresentando sinais clínicos compatíveis com Febre do Rio Potomac. Nesta região, caramujos do gênero *Heliobia* sp. e cercárias *Parapleurolophocecous cercariae* foram positivas na PCR para *N. risticii*, indicando a possível participação de moluscos e trematódeos no ciclo biológico do parasita no Brasil (COIMBRA et al., 2005).

### **2.1.3. Epizootiologia da erliquiose e anaplasnose em carnívoros selvagens**

Quando raposas vermelhas (*Vulpes fulva*) e cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*) foram experimentalmente infectadas com *E. canis*, não foram observados sinais clínicos de erliquiose. Por outro lado, sinais hematológicos (anemia moderada, trombocitopenia e leucopenia) foram observados na fase aguda da doença tanto em raposas vermelhas quanto cinzas experimentalmente infectadas com o agente da erliquiose monocítica canina. O parasita foi subsequentemente transmitido para cães por meio de

*Rhipicephalus sanguineus* alimentados em raposas infectadas experimentalmente (AMYX e HUXSOLL, 1973).

Utilizando isolamento em cultura celular, Price e Karstad detectaram *E. canis* em 8/16 (50%) chacais (*Canis mesomelas*) de vida-livre no Kenia. Filhotes de cães, quando inoculados com sangue de chacais infectados, desenvolveram doença clínica, e *E. canis* foi isolada destes animais. Os chacais infectados se encontravam parasitados por carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Haemaphysalis* (PRICE e KARSTAD, 1980).

Davidson et al. (1999) verificaram que raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), mas não raposas cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*) são reservatórios potenciais para *E. chaffeensis*. Enquanto raposas cinzas mostraram-se refratárias à infecção experimental por *E. chaffeensis*, raposas vermelhas mostraram-se susceptíveis, sendo que o parasita foi isolado do sangue entre 7 e 14 dias pós-infecção, soroconverteram no 7º dia pós-infecção, e positivaram na PCR no 28º dia pós-infecção. As raposas permaneceram assintomáticas (DAVIDSON et al., 1999).

Buoro et al. (1994) observaram em um leão adulto, em seu hábitat natural, a presença de carrapatos do gênero *Haemaphysalis*. O animal apresentava sintomatologia compatível com erliquiose e presença de mórulas características de *Ehrlichia* sp. em monócitos sangüíneos e em células mononucleares a partir de impressão de órgãos.

Alexander et al. (1994) detectaram anticorpos anti-*E. canis* em apenas um (2%) chacal (*Canis mesomelas*) no Kenia, dentre uma amostra de 76 chacais de vida-livre.

A partir de uma amostra de 53 chacais (*Canis aureus syriacus*) de vida livre de Israel, Waner et al. (1999) conduziram um levantamento sorológico para agentes Anaplasmataceae. Anticorpos anti-*E. canis* foram detectados em 35,8% das amostras de soro. Vinte e seis por cento (26%) dos animais foram soropositivos para *E. chaffeensis*, representando provavelmente reação cruzada com o antígeno de *E. canis*. Anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram detectados em 26% dos chacais, sendo que 5,7% mostraram-se soropositivos somente para o agente em questão (WANER et al., 1999).

Anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum* foram detectados em 46/1550 (2,8%) raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Suíça (PUSTERLA et al., 1999).

Com o objetivo de determinar o papel dos coiotes na epidemiologia da erliquiose monocítica e granulocítica na Califórnia, EUA, Pusterla et al. (2000) testaram 149 amostras de soro por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta para agentes Anaplasmataceae. Sessenta e cinco coiotes (46%) foram soropositivos para *A. phagocytophilum*, dois (1%) para *N. risticii*; nenhum animal mostrou-se soropositivo para *E. canis*. Dois coiotes mostraram-se positivos na PCR para *N. risticii*. Um único animal mostrou-se positivo na PCR para o genogrupo *A. phagocytophilum* (PUSTERLA et al., 2000).

Utilizando uma nested PCR, DNA de *E. chaffeensis* foi detectado em 15 (71%) coiotes (*Canis latrans*) das regiões central e norte do estado de Oklahoma, EUA (KOCAN et al., 2000b).

Uma soroprevalência de 54,3% (25/46) frente ao antígeno de *E. canis* foi encontrada entre chacais (*Canis aureus*) em Israel (SHAMIR et al., 2001).

Na Holanda, anticorpos anti-*Ehrlichia* sp. foram detectados em 13% de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (GROEN et al., 2002).

Em Israel, a partir de uma amostra de 84 raposas vermelhas, 36% mostraram-se soropositivas para *E. canis* (FISHMAN et al., 2004).

Na Califórnia, a distribuição geográfica de raposas cinzas sobrepõem a área de distribuição da anaplasmoose granulocítica em humanos e animais domésticos (GABRIEL et al., 2009). Em uma amostragem de 70 raposas, 51% apresentaram-se soropositivas frente ao antígeno de *A. phagocytophilum*; seis raposas foram positivas na PCR para este agente. Raposas cinzas podem atuar como sentinelas da infecção por *A. phagocytophilum* na Califórnia (GABRIEL et al., 2009).

Uma soroprevalência de aproximadamente 4% foi encontrada em lincos (*Lynx lynx*) da Suíça frente ao antígeno de *A. phagocytophilum*, sugerindo que estes animais são expostos ao agente da erliquiose granulocítica humana (RYSER-DIGIORGIS et al., 2005).

Filoni et al. (2006) detectaram alto título de anticorpos anti-*E. canis* (20480) em uma suçuarana brasileira (*Puma concolor*) de vida livre.

Recentemente, DNA de *Ehrlichia* sp., filogeneticamente relacionada (99%) à amostras encontradas no Japão e Rússia e também à *E. ruminantium* (98,7%), foi detectado em duas onças de vida-livre no Pantanal Mato-Grossense (WIDMER et al., 2011). Ainda neste estudo, anticorpos anti-*E. canis* foram encontradas em 4 das 10 onças amostradas.

A presença de DNA de *A. phagocytophilum* foi detectada em oito pumas na Califórnia. Dos 47 animais analisados, 16% mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *A. phagocytophilum*. Dezenove por cento (19%) dos "pools" de carrapatos ingurgitados coletados desses animais foram positivos na PCR (FOLEY et al., 1999).

#### **2.1.4. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos**

Após um período de incubação de 8 a 20 dias, na fase aguda da erliquiose canina por *E. canis*, são observados febre, descarga oculonasal, anorexia, depressão, perda de peso e linfadenopatia, anemia, trombocitopenia e contagem leucocitária variável (CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008). Na fase subclínica (com duração variando entre 40 e 120 dias), ocorre ausência de sinais clínicos, porém as alterações laboratoriais persistem, principalmente trombocitopenia e hipergamaglobulinemia. A fase crônica é caracterizada por perda de peso, pobre condição corporal, supressão da medula óssea, levando à anemia crônica, leucopenia e trombocitopenia, tendências hemorrágicas (epistaxe, melena, petéquias, equimoses, hifema, hemorragia retiniana e hematúria), uveíte anterior (ORIÁ et al., 2004) e alterações neurológicas (ataxia, paraparesia, déficit proprioceptivo, nistagmo, convulsão) (COHN, 2003). Na erliquiose por *E. ewingii*, claudicação, dores e edemas articulares são observados (COHN, 2003). Na erliquiose por *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, doença clínica moderada é a forma mais frequentemente observada. Trombocitopenia cíclica moderada a severa é encontrada na infecção por *A. platys* em cães (WOODY e HOSKINS, 1991; COHN, 2003). Cães infectados com *N. helminthoeca* apresentam febre, depressão, perda de peso, desidratação, anorexia, polidipsia, vômitos, diarreia sanguinolenta e linfadenopatia (HEADLEY et al., 2011).

Felídeos infectados por *E. canis* apresentam febre, apatia, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia normocítica e

normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, aumento da atividade sérica das transaminases e fosfatase alcalina e hiperglobulinemia (BUORO et al., 1989; BUORO et al., 1994; BOULOY et al., 1994; PEAVY et al., 1997; ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY e MASSARD, 1999; STUBBS et al., 2000; SHAW, 2001; BREITSCHWERDT et al., 2002). Gatos experimentalmente infectados por *N. risticii* apresentam diarreia intermitente, linfadenopatia, depressão aguda e anorexia entre 20 e 24 dias após inoculação (DAWSON et al., 1988). Já a infecção por *A. phagocytophilum* em felinos é caracterizada por hiperestesia, mialgias, artralgias, rigidez de pescoço, claudicação, incoordenação, neutrofilia com desvio a esquerda, linfopenia, além dos outros sinais clínico-laboratoriais comuns à erliquiose canina (BJOERSDORFF et al., 1999; TARELLO, 2005).

#### **2.1.5. Achados patológicos**

Os principais achados patológicos na erliquiose canina são caracterizados por hemorragias petequiais e hemorrágicas, hiperplasia reticuloendotelial generalizada, edema, infiltração plasmocítica em diversos órgãos, lesões renais (vasculite) e pneumonia intersticial (WOODY e HOSKINS, 1991; CASTRO et al., 2004).

Poucos são os relatos de achados de necropsia em felinos portadores de erliquiose clínica. Sinais de caquexia, emaciação, diarreia, distúrbio congestivo hemorrágico, notavelmente nos pulmões, foram achados anátomo-patológicos em gatos jovens inoculados experimentalmente com *E. canis* (ALMOSNY e MASSARD, 2002). Observações a partir de biópsias de linfonodos mesentéricos revelaram um infiltrado inflamatório (neutrófilos e macrófagos), caracterizando uma linfadenite piogranulomatosa (BOULOY et al., 1994).

#### **2.1.6. Diagnóstico**

O uso de esfregaços citológicos a partir da camada leucocitária e linfonodos podem levar a um diagnóstico definitivo de infecções por agentes Anaplasmataceae, em sua fase aguda. Mórulas devem ser diferenciadas de estruturas intra e extracelulares semelhantes a elas, a fim de evitar diagnósticos falso-positivos, tais como: plaquetas, material nuclear fagocitado em monócitos, grânulos azurófilos em

linfócitos e corpos linfoglandulares (MYLONAKIS et al., 2003; DAGNONE et al., 2009). A detecção direta por meio de esfregaços sangüíneos é uma técnica rápida e confirmatória, porém de baixa sensibilidade; além do baixo número de células com mórulas, a sensibilidade é afetada pela experiência do microscopista e pelo baixo número de esfregaços e células examinadas (PADDOCK e CHILDS, 2003; MYLONAKIS et al., 2003; PASSOS et al., 2005; DAGNONE et al., 2009).

Embora os testes sorológicos sejam os mais freqüentemente utilizados para o diagnóstico da erliquiose e anaplasiose, sabe-se que as várias espécies da família Anaplasmataceae dividem antígenos em comum, gerando reações cruzadas. Dessa forma, são requeridas interpretação cuidadosa e correlação dos testes diagnósticos com achados clínicos e epidemiológicos para evitar designação incorreta do agente em questão. A sorologia pode resultar em resultados negativos durante a primeira semana de infecção (WALKER e DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003) e não distingue uma infecção corrente de uma exposição sem estabelecimento de infecção ou infecção prévia (SHAW, 2001). Existe ainda uma considerável variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos (SHAW et al., 2001). A PCR em combinação com a RIFI traz um diagnóstico rápido e coerente da erliquiose (IQBAL et al., 1994; NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010).

A realização de uma PCR, amplificando DNA de todas as espécies Anaplasmataceae seguida por seqüenciamento, é uma ferramenta útil para o estudo epidemiológico da infecção por esses agentes em carrapatos e vertebrados (INOKUMA et al., 2001b). Sempre que possível, fragmentos amplificados pela PCR devem ser seqüenciados para confirmar a validade dos resultados da PCR quando o ensaio está sendo feito para diferenciar espécies Anaplasmataceae, particularmente quando a PCR é aplicada a amostras derivadas de várias espécies animais (HANCOCK et al., 2001; MASSUNG e SLATER, 2003; DAGNONE et al., 2009).

### **2.1.7. Tratamento**

Tetraciclina e doxiciclina são drogas de escolha para o tratamento da erliquiose canina e felina (WOODY e HOSKINS, 1991; COHN, 2003; BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004).

### **2.1.8. Erliquiose humana**

A erliquiose humana vem ganhando especial atenção como um problema de saúde pública e é causada por *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *N. sennetsu* e *A. phagocytophilum* (WALKER e DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001; UNVER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003; TAMÍ e TAMÍ-MAURY, 2004; PAROLA et al., 2005; WORMSER et al., 2006). No Brasil, os primeiros casos suspeitos de erliquiose humana foram descritos no estado de Minas Gerais, por meio de sintomatologia clínica compatível e sorologia positiva para *E. chaffeensis* (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2005; COSTA et al., 2006).

## **2.2. Infecções por micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)**

### **2.2.1. Agentes etiológicos**

Micoplasmas hemotróficos são bactérias fastidiosas, de reduzido tamanho e genoma, com ausência de parede celular e flagelo, resistentes à penicilina e susceptíveis à tetraciclina e que infectam eritrócitos, permanecendo ligadas à superfície destas células. Felinos podem ser parasitados por *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. Canídeos, por sua vez, podem ser parasitados por *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Hemoplasmas felinos mostram uma relação filogenética muito próxima com hemoplasmas de canídeos e roedores. Sequências derivadas do gene *16S rRNA* de *Candidatus M. turicensis* mostram alto grau de identidade com *M. coccoides* (92%) e *M. haemomuris* (90%) (WILLI et al., 2005). *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum* mostram 99% e 94% de identidade com *M. haemocanis* e *M. haematoparvum*, respectivamente (BIRKENHEUER et al., 2002; SYKES et al., 2005).

### **2.2.2. Transmissão**

Felinos machos, com acesso à rua e de idade mais avançada são considerados fatores de risco para hemoplasmoses. O contato social é também considerado, por muitos autores, como um fator de risco. *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e

*Candidatus Mycoplasma turicensis* já foram detectados em saliva de gatos, embora a transmissão por meio da inoculação de saliva infectada subcutaneamente em gatos não tenha surtido efeito (DEAN et al., 2008; MUSEAUX et al., 2009). Assim, o contato social pode ser considerado uma forma de transmissão dos hemoplasmas se interações agressivas (brigas) são observadas, e ainda, se ocorrer inoculação de sangue infectado (por meio de mordidas, por exemplo) (MUSEAUX et al., 2009).

*Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *M. haemofelis* foram detectados em *Ctenocephalides felis* coletadas de gatos e em fezes destas pulgas (LAPPIN et al., 2006; SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005). Embora a pulga *Ctenocephalides felis* seja incriminada como vetor dos hemoplasmas, estudos experimentais conduzidos não trouxeram resultados consistentes, onde se verificou que somente um de seis gatos tornaram-se PCR positivos após serem expostos a pulgas positivas na PCR para *M. haemofelis* (WOODS et al., 2005). A ingestão de pulgas infectadas com *M. haemofelis* ou *Candidatus M. haemominutum* ou de seus produtos (fezes, ovos ou larvas) não transmitiu os parasitas para gatos (WOODS et al., 2006). DNA de *Candidatus M. haemominutum* foi detectado em carrapatos *Ixodes ovatus* no Japão (TAROURA et al., 2005). DNA de *M. haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum* foi detectado em *Rhipicephalus sanguineus* parasitando leões na Tanzânia (FYUMAGWA et al., 2008). O carrapato *R. sanguineus* além de transmitir experimentalmente *M. haemofelis*, também atua como reservatório do parasita, uma vez que é observada transmissão transovariana e transestadial nesta espécie de artrópode (SENEVIRATNA et al., 1973). Ainda, a associação entre presença de ectoparasitas, acesso ao ambiente peridomiciliar e infecção por hemoplasmas reforça a hipótese de que tais agentes sejam transmitidos por artrópodes vetores (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Outras formas de transmissão da hemoplasmose incluem: transfusão sanguínea; transmissão vertical durante a prenhez e horizontal durante o nascimento ou lactação; e transmissão iatrogênica (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

### 2.2.3. Epizootiologia da hemoplasmose em carnívoros selvagens

Infecções por hemoplasmas têm sido reportadas em felinos no mundo todo. Por outro lado, micoplasmas hemotróficos têm sido detectados em felídeos selvagens de vida-livre e de cativeiro da América do Norte (tigres), Europa (lince ibérico e gatos-selvagens europeus), África (leões) e América do Sul (jaguar, gatos-maracajá, leões, gatos-do-mato-grande, gatos-do-mato-pequeno e suçuaranas) (HAEFNER et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2007; WILLI et al., 2007b). Co-infecção com mais de uma espécie de hemoplasma tem sido reportada entre felídeos selvagens (WILLI et al., 2007b).

Hemoplasmas são mais frequentemente encontrados em felídeos selvagens de vida livre, quando comparados àqueles de cativeiro. Felídeos selvagens de vida livre apresentam maior chance de exposição a artrópodes vetores hematófagos e maior atividade em brigas, favorecendo desta forma a transmissão dos micoplasmas hemotróficos (WILLI et al., 2007b).

### 2.2.4. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da hemoplasmose estão na dependência do agente etiológico, estágio da doença e da presença de doença concomitante (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Infecções agudas com *M. haemofelis* são caracterizadas por crises hemolíticas fatais, inclusive em felinos domésticos imunocompetentes. Sinais clínicos típicos incluem: palidez, letargia, fraqueza, taquicardia, taquipnéia, esplenomegalia, linfadenopatia e ocasionalmente icterícia. Pico de parasitemia e mínimo volume corpuscular médio (VCM) são observados 2 semanas após a infecção, sendo que alguns gatos mostram rápidas flutuações na bacteremia ao longo do tempo. Essa flutuação no número de parasitas é devido a alterações antigênicas que promovem o destacamento do parasito da superfície do eritrócito (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

*Candidatus M. haemominutum* usualmente não provoca diminuição significativa do VCM, sendo que a queda no VCM é reportada em gatos co-infectados com retrovírus ou sob quimioterapia. Máxima bacteremia é observada 4-5 semanas após

infecção, sendo que flutuações na contagem de parasitas não é verificada ao longo do tempo (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

O potencial patogênico de *Candidatus M. turicensis* parece depender de co-fatores, tais como imunossupressão ou co-infecção com outros hemoplasmas. A anemia geralmente é moderada. O pico de bacteremia se dá entre 14 e 18 dias pós-infecção e flutuação na quantidade de hemoplasmas não é verificada (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Felinos infectados com hemoplasmas podem permanecer como carreadores crônicos por meses a anos, mesmo quando tratados com antibióticos. Estes carreadores aparentemente saudáveis podem atuar como fonte de infecção para outros gatos, sendo que a reativação da doença tem sido raramente documentada. O estado de carreador é comumente encontrado com *Candidatus M. haemominutum*, porém é menos freqüente em infecções por *M. haemofelis*. Por outro lado, “clearance” da infecção por *Candidatus M. turicensis* tem sido reportada (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Em cães, infecções por *M. haemocanis* são caracterizadas pela presença de grande número de eritrócitos parasitados e rápido desenvolvimento de anemia, a qual é mais frequentemente encontrada em cães imunocomprometidos, esplenectomizados ou com infecções intercorrentes (erliquiose, babesiose, etc). Os sinais clínicos incluem anorexia, letargia, perda de peso e febre. O VCM pode chegar a 11%. Geralmente, cães se recuperam da infecção, porém permanecem cronicamente infectados. Na forma crônica da infecção, os parasitas são encontrados raramente na circulação e em baixos números. Anemia moderada, leucopenia e pica são sinais que podem ser observados na fase crônica da infecção (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

### **2.2.5. Achados laboratoriais**

Hemoplasmoses são caracterizadas por hemólise extravascular, gerando uma anemia regenerativa, macrocítica e hipocrômica, reticulocitose, anisocitose, policromasia, corpúsculos de Howell-Jolly e algumas vezes aumento do número de células vermelhas nucleadas. Alguns gatos mostram discreto grau de regeneração

devido à fase inicial da anemia ou infecção retroviral concomitante (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem da anemia e hemólise na hemoplasmosse. A simples presença dos hemoplasmas na superfície das hemácias por si só gera danos à membrana destas células. Anticorpos anti-hemoplasmas podem atingir as hemácias, ou ainda, podem ser direcionados para a superfície destas próprias células, devido a uma modificação antigênica induzida pela presença dos parasitas (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010)

Bioquímica sérica revela hiperbilirrubinemia, hiperproteinemia e aumento dos níveis séricos de enzimas hepáticas (decorrente do dano hipóxico). Positividade nos testes de aglutinação em solução salina e de Coomb's também são reportados (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

#### **2.2.6. Diagnóstico**

O método mais comumente utilizado para diagnóstico da hemoplasmosse é a demonstração de organismos na superfície dos eritrócitos por meio da microscopia de luz de esfregaços sanguíneos. As colorações do tipo Romanowsky (Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Wright e Wright-Giemsa) são as mais frequentemente utilizadas. Os organismos são tipicamente encontrados na periferia das hemácias, podendo ser encontrados na forma única, em pares, ou em cadeias em severas infestações. Ocasionalmente, podem ser vistos livre dos eritrócitos. *Mycoplasma haemocanis*, por sua vez, pode aparecer também na forma de cadeias divididas (forma de "Y" ou de violino) (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Diagnóstico diferencial deve ser feito com anemia hemolítica imunomediada, outras causas de anemia (peritonite infecciosa felina, cytauxzoonose e infecções retrovirais), anemia hemolítica por corpúsculos de Heinz, desordens eritrocíticas tais como deficiência de piruvato quinase, e desordem de fragilidade eritrocítica de gatos abissínios e somali (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

A detecção citológica por meio de esfregaços sanguíneos apresenta pobre sensibilidade. *Mycoplasma hemofelis* é visibilizado em menos de 50% das vezes em gatos em fase aguda da doença, considerando o fato que os parasitas podem desaparecer por vários dias antes de reaparecer nos esfregaços sanguíneos durante o curso da infecção. A escolha por esfregaços sanguíneos frescos é imperativa, uma vez que os parasitas se destacam das hemácias na presença de EDTA. *Candidatus M. turicensis* nunca foi observado em esfregaços sanguíneos. *Candidatus M. haemominutum* geralmente não é visível em esfregaços sanguíneos de gatos cronicamente infectados e, embora de tamanho menor que *M. haemofelis*, a diferenciação morfológica entre ambos é difícil (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Resultados falso-positivos podem ocorrer com precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly (remanescentes nucleares com 1-2 $\mu$ m), corpúsculos de Pappenheimer (agregados de acumulação de ferro) e artefatos refráteis (umidade aderente às células) (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

A coloração pelo orange de acridina e a Imunofluorescência Direta são métodos mais sensíveis que a coloração pelo Romanowsky. O corante orange de acridina se combina especificamente com ácidos nucleicos, corando os micoplasmas em laranja brilhante. Corpúsculos de Howell-Jolly também se coram pelo orange de acridina (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Atualmente, a PCR é o método de escolha para o diagnóstico de infecções por hemoplasmas. As PCRs descritas na literatura amplificam os gene *16S rRNA* (BERENT et al., 1998) e *mnpB* (subunidade  $\beta$  da RNA polimerase) (BIRKENHEUER et al., 2002). A PCR em tempo real permite a quantificação do DNA de hemoplasmas no sangue de animais, facilita a verificação da resposta ao tratamento e previne riscos de contaminação por produtos de PCR (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Felinos domésticos que recebem antibioticoterapia apresentam resultados negativos na PCR dentro de poucos dias após tratamento, porém resultados positivos

são verificados novamente uma semana após o término do tratamento (FOLEY et al., 1998). Desta forma, amostras de sangue direcionadas à PCR para hemoplasmas devem ser coletadas antes de iniciada a antibioticoterapia (WILLI et al., 2007a).

Considerando o fato de que os hemoplasmas ainda não foram cultivados in vitro, testes sorológicos baseados em proteínas do parasita ainda não fazem parte da rotina de diagnóstico desta enfermidade. Experimentalmente, anticorpos anti-*M. haemofelis* foram detectados 21 dias pós-infecção pela imunofluorescência indireta e persistiram seis meses após a cura clínica (FOLEY et al., 1998). Recentemente, tentativas de expressão de antígenos recombinantes vem sendo desenvolvidas a fim de permitir o diagnóstico sorológico destes agentes (MESSICK e SANTOS, 2011).

### **2.2.7. Tratamento**

O tratamento é indicado para animais com sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com hemoplasmose. O tratamento de animais positivos na PCR, porém assintomáticos, não é recomendado, já que os tratamentos existentes não eliminam totalmente os parasitas. O protocolo de tratamento para hemoplasmose é doxiciclina (10mg/kg/dia PO) durante, no mínimo, duas semanas, acompanhado de transfusão sanguínea quando necessário. Para gatos, em função do potencial de esofagite causado pelo uso de doxiciclina, a ingestão do antibiótico deve ser seguida pela ingestão de grande quantidade de água. O uso de doses imunossupressivas de glicocorticóides para supressão de uma anemia hemolítica imunomediada é controverso, uma vez que glicocorticóides podem causar a reativação de uma infecção latente, porém é indicado em casos de gatos que falham em responder somente à antibioticoterapia, ou em casos nos quais o diagnóstico é incerto (TASKER e LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2007a; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

### **2.2.8. Hemoplasmose em humanos**

No Brasil, *Mycoplasma haemofelis* e *Bartonella henselae* foram detectados no sangue de um paciente humano HIV-positivo hospitalizado (DOS SANTOS et al., 2008). Dois dos cinco gatos pertencentes ao paciente foram também positivos para *M. haemofelis*; os cinco gatos estavam infectados por *B. henselae*. Hemoplasmas podem,

possivelmente, atuar como um agravante em pacientes imunocomprometidos (DOS SANTOS et al., 2008).

### **2.3. Infecções por *Babesia* sp.**

#### **2.3.1. Agentes etiológicos**

A babesiose, causada pela infecção de protozoários parasitas apicomplexos intra-eritrocíticos pertencentes ao gênero *Babesia*, é uma das infecções mais comuns de animais de vida livre em todo o mundo. Embora capaz de infectar uma grande variedade de vertebrados, as babesias requerem hospedeiros vertebrados e invertebrados para a manutenção do seu ciclo de transmissão. Os parasitas replicam-se nas hemácias dos hospedeiros vertebrados e são chamadas de piroplasmas devido à sua aparência de dupla pêra (HOMER et al., 2000).

Grandes e pequenos piroplasmas têm sido reportados em vários carnívoros selvagens e domésticos (PENZHORN, 2006; UILEMBERG, 2006). Frequentemente, os relatos são uma mera documentação de organismos vistos em esfregaços sangüíneos realizados randomicamente em animais sadios e, em uma minoria de casos, são incriminados como agentes causadores de doenças em seus hospedeiros. A nomenclatura e descrição dos hematozoários são inadequadas aos padrões atuais e a maioria dos parasitos tem sido nomeada de acordo com seu hospedeiro (UILEMBERG, 2006). Em contraste com essas descrições informais do passado, a definição e identificação atual de espécies têm se tornado muito mais rigorosas, sendo suportada principalmente por caracterizações moleculares (PENZHORN, 2006), uma vez que a mera evidência sorológica também seja insuficiente (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999).

Felídeos domésticos podem ser parasitados por *Babesia felis* (DAVIS, 1929), *B. cati* (MUDALIAR et al., 1950), *B. canis canis* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003a,b) e *B. canis presentii* (BANETH et al., 2004). Já os felídeos selvagens podem ser parasitados por *B. felis* (DAVIS, 1929), *B. herpailuri* (DENNIG, 1967), *B. pantherae* (DENNIG e BROCKLESBY, 1972), *B. leo* (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999; PENZHORN et al., 2001) e por piroplasmas não identificados encontrados em chitas (*Acinonyx jubatus*) (AVERBECK et al., 1990) e pumas (YABSLEY et al., 2006).

Morfológicamente, as babesias são classificadas em pequenos piroplasmas (< 1,5 µm) e grandes piroplasmas (>2,5 µm). Pequenos piroplasmas encontrados em felinos incluem *B. felis* e *B. leo*. *Babesia cati*, *B. pantherae*, *B. canis canis*, *B. canis presentii* e *B. herpailuri* são exemplos de grandes piroplasmas encontrados em felinos (YABSLEY et al., 2006).

Baseado em análises moleculares, os piroplasmas são classificados em quatro grandes grupos: 1) *Babesia sensu stricto* (as “verdadeiras” babesias); 2) *Theileria* e *Cytauxzoon*; 3) piroplasmas de humanos e de animais selvagens; e 4) *B. microti* e pequenas babesias (KJEMTRUP et al., 2000). As duas subespécies de *B. canis* encontradas em felinos domésticos são posicionadas no grupo das verdadeiras babesias (grupo 1) (CRIADO-FORNELIO et al., 2003b; BANETH et al., 2004). Já os piroplasmas de felídeos africanos (*B. leo* e *B. felis*) e a espécie relacionada à *B. microti* (referida como *T. annae*) encontrada em Portugal, são inclusas no grupo das pequenas babesias/ *B. microti* (PENZHORN et al., 2001). A relação filogenética entre *B. pantherae* e *B. herpailuri* com outros piroplasmas ainda é desconhecida (YABSLEY et al., 2006).

### **2.3.2. *Babesia canis***

Em cães, é muito comum a infecção concomitante por *E. canis* e *B. canis* (TROY e FORRESTER, 1990; TABOADA, 1998; OLIVEIRA et al., 2008). A babesiose canina, uma doença hemolítica com distribuição mundial e com significância global, é causada por grandes piroplasmas descritos como *B. canis* e por pequenos parasitas agrupados sob a denominação de *B. gibsoni* (BOOZER e MACINTIRE, 2003).

A *Babesia canis* é um grande piroplasma (3-5 µm), com formato piriforme e que geralmente ocorre aos pares dentro dos eritrócitos dos hospedeiros (LOBETTI, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003). Três subespécies de *B. canis* têm sido descritas com base em diferenças nas síndromes clínica e patológica causadas por cada subespécie, propriedades antigênicas, transmissão por diferentes carrapatos vetores e caracterização genética. *Babesia canis rossi*, descrita na África do Sul, é transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* e causa uma doença hemolítica severa e freqüentemente fatal em cães. *Babesia canis vogeli* é encontrada no Oriente Médio, Norte da África, Europa, Ásia, Austrália e América do Sul e é transmitida pelo

*Rhipicephalus sanguineus*, induzindo normalmente uma doença de sinais clínicos moderados em cães. *Babesia canis canis*, descrita na Europa, é transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* e causa anemia hemolítica com variados graus de severidade e anormalidades da coagulação (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005). No Brasil, confirmou-se molecularmente que cães podem ser parasitados por *B. canis vogeli* (PASSOS et al., 2005; SPOLIDORIO et al., 2011) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006).

### **2.3.3. Ciclo Biológico da *Babesia canis***

Em cães, a *Babesia canis*, assim como a *Ehrlichia canis*, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é considerado reservatório para *B. canis vogeli*, mas não para *E. canis*. A presença de cães infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos já que não ocorre transmissão vertical nestes artrópodes (NEER, 1998). *B. canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e ser passada para a próxima geração de carrapatos na ausência de cães infectados (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003). Embora se acredite que a babesiose felina seja transmitida por carrapatos, o vetor ainda não foi identificado (PENZHORN et al., 2004).

No momento do repasto sangüíneo, o carrapato infectado inocula no cão, esporozoítas presentes nas glândulas salivares. Estes se aderem à membrana do eritrócito e, por endocitose, penetram na hemácia multiplicando-se por divisão binária, resultando na formação de merozoítas. Podem-se encontrar hemácias com até dezesseis merozoítas, mas o mais comum é que se observe um ou um par dos mesmos. Para que outras hemácias sejam parasitadas, os merozoítas deixam as células hospedeiras, encontrando-se livres na corrente sangüínea, por um curto período, e invadem outros eritrócitos (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998). Ao ingerir o sangue de um cão parasitado, o carrapato infecta-se com eritrócitos contendo diferentes estágios evolutivos da *B. canis*. Nas células intestinais do carrapato, as formas não assexuadas se degeneram, e os gametócitos transformam-se em gametas e, então, em corpos raiados. Após a fusão dos gametas masculino e feminino, os

zigotos assim formados se transformam em cinetos móveis. Essas formas evolutivas atravessam a parede intestinal, caem na cavidade geral do artrópode e, por esporogonia, transformam-se em esporocinetos, infectando vários órgãos do carrapato, incluindo as glândulas salivares e ovários. A esporogonia continua nas glândulas salivares e nas larvas oriundas de ovos infectados, dando origem a milhares de esporozoítas, que serão transmitidos a outros hospedeiros por ocasião do repasto sanguíneo (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; BORDEAU e GUELFY, 1995; TABOADA, 1998; MARQUARDT et al., 2000).

#### **2.3.4. Epizootiologia da babesiose em carnívoros selvagens**

DAVIS (1929) descreveu, pela primeira vez, a presença de um pequeno piroplasma, nomeado *Babesia felis*, parasitando um gato selvagem africano (*Felis silvestris*) do Sudão. O parasita foi então transmitido a felinos domésticos, embora não tenha causado doença clínica (DAVIS, 1929). Posteriormente, o mesmo agente foi incriminado como o agente causador de um quadro clínico severo em felinos domésticos na África do Sul (FUTTER e BELONJE, 1980a).

*Babesia herpailuri*, uma grande babesia, foi isolada de uma espécie sul-americana, o gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) (DENNIG, 1967).

Uma *Babesia* não identificada, com formas simples, pareadas ou agrupadas, geralmente com ângulos agudos, foi observada em esfregaços sanguíneos de um gato do Zimbábue com anemia. A morfologia do referido parasita aproximou-se, dentre todas as demais espécies de *Babesia* encontradas em felídeos, com a de *B. herpailuri* (STEWART et al., 1980).

Averbeck et al. (1990) encontraram um piroplasma morfológicamente semelhante à *Theileria felis* em 123 leões e oito chitas da Tanzânia.

No Parque Nacional Kruger, na África do Sul, por meio de um programa de monitoramento de cães selvagens (*Lycaon pictus*), trofozoítos de *B. canis* foram encontrados em esfregaços sanguíneos de dois animais (VAN HEERDEN et al., 1995). Ainda, um caso de babesiose fatal foi reportado em um filhote de cão selvagem (*Lycaon pictus*) na África do Sul. O animal apresentava palidez de mucosas, icterícia, respiração laboriosa, esplenomegalia, anemia e hemoglobinúria. O diagnóstico foi confirmado por

meio da presença da observação de *Babesia* sp. em esfregaços sanguíneos do animal. A despeito do tratamento, o animal veio a óbito (COLLY e NESBIT, 1992).

Um pequeno piroplasma foi detectado em esfregaços sanguíneos de 47 leões (*Panthera leo*) da África do Sul, cujos soros foram negativos frente ao antígeno de *Babesia felis*. A partir do sangue desses animais, reproduziu-se a infecção em um leão, em um gato e um leopardo, sendo que nos dois últimos foram encontrados piroplasmas nos esfregaços sanguíneos. Os autores acreditaram tratar-se de uma nova espécie de *Babesia*, morfológicamente similar a *B. felis* e *C. felis*, mas antígenicamente distinta (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999). PENZHORN et al. (2001), através de análises filogenéticas, nomearam de *Babesia leo* este novo piroplasma isolado dos leões.

Coiotes (*Canis latrans*), quando experimentalmente infectados com *B. gibsoni*, mostraram sinais clínico-laboratoriais característicos de babesiose, tais como palidez de membranas mucosas, depressão, inapetência, anemia regenerativa, trombocitopenia e neutropenia. A presença de sinais clínicos moderados associada à alta parasitemia (1-11%) de longa duração (detectável até 20 semanas pós-infecção) sugere que os coiotes possam ser reservatórios para *B. gibsoni* (EVERS et al., 2003).

Yabsley et al. (2006) utilizaram uma nested PCR baseada na porção 18S rRNA para detectar DNA de piroplasmas em 41 panteras-da-Flórida (*P. concolor coryi*) e dois “cougars”-do-Texas (*P. concolor stanleyana*). Trinta e dois animais mostraram-se positivos para *Babesia* sp. O fragmento de DNA amplificado encontrado apresentou similaridade genética com uma amostra de *Babesia* sp. detectada em carrapatos da espécie *Ixodes ovatus* no Japão, *B. odocoilei* e *B. divergens*. A infectividade e patogenicidade desta *Babesia* sp. para felinos domésticos é desconhecida (YABSLEY et al., 2006).

Bosman et al. (2006), através da técnica de hibridização reversa (RLB, “Reverse Line Blot”), mostrou que *B. felis* e *B. leo* ocorrem como infecções únicas ou mistas em várias espécies de felídeos, porém mais frequentemente em felinos domésticos e leões, respectivamente. Ainda neste estudo, um grande número de amostras testadas mostrou-se positiva apenas para o gênero *Babesia*, mas não para *B. felis* ou *B. leo*, levando a suposição de que existam mais espécies de *Babesia* que possam parasitar os felídeos.

### 2.3.5. Sinais clínicos

Animais selvagens podem apresentar manifestações clínicas de babesiose semelhantes às observadas em animais domésticos quando colocados em cativeiro em áreas não nativas (PENZHORN, 2006).

Animais mantidos em cativeiro podem não ser expostos aos seus parasitos naturais e assim, não desenvolvem imunidade aos mesmos. Se estes animais são então introduzidos na natureza com o objetivo de aumentar o número de indivíduos de populações diminuídas ou estabelecer novas populações, eles poderão sucumbir a tais parasitos. Infecção artificial destes animais com parasitos específicos seguida de tratamento anti-*Babesia* pode ser uma solução prática (PENZHORN, 2006).

Muitos animais silvestres são capturados para translocação a fim de estabelecer novas populações ou aumentar o número de indivíduos de populações já existentes. Neste tipo de conservação *ex situ*, animais mantidos em cativeiro são liberados na natureza. Tal ação pode criar condições favoráveis para o desenvolvimento de babesiose clínica, através da recrudescência de infecções latentes mediante o estresse gerado ou através da primo-infecção de animais *naïve* (PENZHORN, 2006).

Infecção de animais silvestres mantidos em cativeiro com uma espécie de *Babesia* de animais domésticos pode ser fatal, uma vez que animais silvestres possuem suas próprias babesias, com variados graus de especificidade a hospedeiros e estabilidade endêmica geralmente previsível. Fatores estressantes tais como captura e manutenção em cativeiro durante certo período de tempo, podem precipitar uma babesiose clínica, causada por parasitas usualmente benignos para os animais silvestres (PENZHORN, 2006).

A babesiose canina se manifesta nas formas hiperaguda, aguda, subclínica e crônica. A forma hiperaguda está associada com choque hipotensivo, hipóxia, dano tecidual, estase vascular e morte. A forma aguda é caracterizada por anorexia, anemia hemolítica, trombocitopenia, linfadenomegalia, letargia, vômito, hematúria, icterícia. Febre intermitente, perda do apetite e marcada perda de condição corporal são sinais freqüentes na forma crônica da babesiose (LOBETTI, 1998).

A babesiose felina tem sido reportada esporadicamente em vários países, mas não parece ser uma doença com significado clínico que ocorra regularmente quando

comparada àqueles casos verificados na África do Sul (PENZHORN et al., 2004). Em contraste com a babesiose em outros animais domésticos, a babesiose felina não está associada com febre e icterícia. A maioria dos felinos afetados são adultos jovens com menos de 3 anos de idade, sem predileção por raça ou sexo. Os sinais clínicos mais encontrados são anorexia, letargia, pêlos espessados, palidez de mucosas, perda de peso e anemia, seguida ou não de icterícia. Sinais menos freqüentes são representados por fraqueza, diarreia de coloração amarelada a alaranjada, constipação e pica (BREITSCHWERDT, 1990; FUTTER e BELONJE, 1980a,b; SCHOEMAN et al, 2001). A parasitemia é variável, podendo ser muito baixa ou muito alta. A forte correlação entre parasitemias central e periférica indica que seqüestração não seja uma característica da enfermidade (BREITSCHWERDT, 1990; SCHOEMAN et al, 2001).

#### **2.3.6. Achados laboratoriais**

A babesiose canina é caracterizada por anemia normocítica e normocrômica na fase inicial, que com o transcorrer da doença se torna macrocítica, hiperocrômica e regenerativa e trombocitopenia. Na bioquímica sérica, hipercalemia e hipoglicemia podem ser notados em animais severamente afetados. Azotemia, acidose metabólica, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobínúria e proteinúria são achados nos exames bioquímicos (LOBETTI, 1998).

Na babesiose felina, anemia (hemolítica, resultante de hemólises intra e extravascular) regenerativa macrocítica e hipocrômica é o achado hematológico mais consistente, embora uma grande proporção de felinos não se apresente anêmicos. A contagem de plaquetas é variável e trombocitopenia é um achado inconsistente (FUTTER et al., 1980). O teste de aglutinação em solução salina pode ser positivo em um grande número de casos, indicando que anemia hemolítica imunomediada pode também ser uma característica da doença (SCHOEMAN et al., 2001). As principais alterações clínico-patológicas são elevação da alanina aminotransferase (injúria ou inflamação hepatocelular primária) e hiperbilirrubinemia (decorrente da hemólise e injúria hepatocelular). Gamopatia policlonal é observada em todos os gatos com hiperglobulinemia, o que pode ser explicado por uma combinação de proteínas de fase

aguda e crônica produzidas em resposta a antígenos de *Babesia* (SCHOEMAN et al., 2001).

### **2.3.7. Achados patológicos**

Cães acometidos por babesiose apresentam como achados patológicos a pigmentação dos tecidos com hemoglobina e bilirrubina, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, edema e hemorragia (decorrente de injúria vascular e pobre oxigenação), eritrócitos parasitados nas redes capilares (principalmente cerebrais), microtrombos em casos de coagulação intravascular disseminada, vasculite, etc (LOBETTI, 1998).

Já os achados anatomopatológicos mais freqüentemente encontrados em felinos com babesiose são extrema palidez de vísceras e sangue aquoso. Icterícia é raramente acentuada. O fígado freqüentemente está aumentado de tamanho, com coloração amarelada ou amarronzada e, em alguns casos, a superfície apresenta um aspecto mosqueado. A vesícula biliar pode estar distendida. O trato intestinal geralmente apresenta conteúdo biliar espesso de coloração amarelada ou amarronzada, com um conteúdo retal invariavelmente amarelo a alaranjado. Urina, quando presente, com coloração amarela ouro. A carcaça usualmente não se encontra emaciada. Linfonodos mesentéricos de tamanho aumentado são ocasionalmente vistos (FUTTER et al., 1981; PENZHORN et al., 2006). Graus variados de necrose hepática centrolobular, estase biliar, hematopoiese extramedular e deposição de hemossiderina são achados histopatológicos encontrados na babesiose felina (FUTTER et al., 1981).

### **2.3.8. Diagnóstico**

A detecção direta de *Babesia* sp. é feita pela visualização de merozoítas nos esfregaços sangüíneos corados com Giemsa, Romanowsky, Field's e Wright's modificado. São técnicas altamente específicas, pois permitem a visualização do parasita, porém são de baixa sensibilidade, já que a parasitemia é variável, impossibilitando, ocasionalmente, a detecção de eritrócitos parasitados, mesmo porque a não detecção da *Babesia* sp. em esfregaços sangüíneos não implica na ausência da infecção. A sensibilidade da técnica pode ser aumentada com a confecção de

esfregaços sangüíneos a partir de punção de capilares de ponta de orelha (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005).

A dificuldade em se detectar o parasita em infecção recente ou na fase crônica da babesiose conduz à pesquisa de anticorpos por meio de métodos sorológicos. As técnicas usualmente empregadas são a Reação de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio Imunoenzimático Indireto (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1999; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005).

A biologia molecular é uma técnica valiosa para o estudo da babesiose em animais selvagens. Um estudo acurado da epidemiologia da babesiose dentre a fauna silvestre deve englobar não somente a detecção molecular, mas também morfologia dos parasitos, interação hospedeiro-parasita e fatores biológicos. Árvores filogenéticas são construídas com base nas *Babesia* sp. de animais domésticos, com algumas espécies obtidas a partir de animais selvagens. Não há dúvida de que estas babesias representam somente a ponta do “iceberg”, e que as relações filogenéticas tornar-se-ão mais claras a partir do momento que as babesias obtidas a partir de animais selvagens forem adicionadas (PENZHORN, 2006). Criado-Fornelio et al. (2004) salientam a necessidade de uma ampla busca seguida de análise molecular dos isolados de piroplasmas em diferentes localidades geográficas, o que seria relevante para a Medicina Veterinária uma vez que isto poderia ajudar a explicar falhas imunodiagnósticas e terapêuticas decorrentes do alto grau de diversidade genética dentro do grupo dos piroplasmas.

### **2.3.9. Tratamento**

Diaceturato de dimiazeno (2,5-3,5 mg/kg, SC ou IM, única dose) e dipropionato de imidocarb (5-7 mg/kg, SC ou IM, 2 doses intervaladas de 2 semanas) são as drogas mais frequentemente utilizadas para tratamento da babesiose canina no Brasil (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

Embora tenham sido observadas a ocorrência de carreadores crônicos da infecção e reagudização de casos após o tratamento convencional, fosfato de primaquina na concentração de 0,5 mg/kg ainda é a droga de escolha no tratamento da

babesiose felina, sendo requerida muitas vezes repetição da terapia por longo período. (POTGIETER, 1981; JACOBSON et al., 2000; PENZHORN et al., 2000; PENZHORN et al., 2006). Doxiciclina pode apresentar benefícios potenciais no tratamento desta doença (PENZHORN et al., 2006).

Co-infecções com *Mycoplasma haemofelis*, vírus da leucemia felina e /ou vírus da imunodeficiência felina têm sido identificadas em um grande número de felinos domésticos, o que parece ter forte efeito na resposta ao tratamento e sobrevivência em animais com babesiose (JACOBSON et al., 2000; SCHOEMAN et al., 2001; SHAW, 2001; PENZHORN et al., 2004; PENZHORN et al., 2006). Embora a resposta à terapia seja geralmente boa e a premunição seja mantida ao longo do tempo, a taxa de mortalidade média para a babesiose felina é de aproximadamente 15% (JACOBSON et al., 2000; PENZHORN et al., 2004; PENZHORN et al., 2006).

#### **2.3.10. Babesiose humana**

A babesiose humana é uma enfermidade transmitida por carrapatos de caráter emergente. Na América do Norte, é causada pela *B. microti*, um parasita de roedores, e por uma espécie reconhecida recentemente chamada de piroplasma WA-1. Na Europa, a babesiose humana, causada pela *B. divergens*, parasita de bovinos, é mais rara, porém mais letal, (HOMER et al., 2000; KJEMTRUP e CONRAD, 2000; MELIANI et al., 2006; WORMSER et al., 2006). MARSAUDON et al. (1995) relatam um caso de infecção por *B. canis vogeli* em um paciente esplenectomizado com insuficiência renal aguda. O primeiro caso de babesiose humana no Brasil foi relatado por Alecrim et al. (1983), em um paciente com sintomatologia compatível e presença de estruturas características de *Babesia* sp. em esfregaços sangüíneos.

### **2.4. Infecções por *Cytauxzoon* sp.**

#### **2.4.1. Agentes etiológicos**

*Cytauxzoon felis* é um protozoário hemoparasita de felinos domésticos e selvagens. Em gatos domésticos, ele é responsável por causar doença clínica severa com alta mortalidade. Organismos do gênero *Cytauxzoon* existem em duas formas

teciduais distintas: a fase eritrocítica, denominada piroplasma e a fase tecidual denominada esquizonte. Parasitas do gênero *Cytauxzoon* são filogeneticamente próximos dos gêneros *Babesia* e *Theileria*. Morfologicamente, pequenos parasitas do gênero *Babesia* são indistinguíveis daqueles do gênero *Cytauxzoon*, porém os primeiros não apresentam uma fase tecidual. Embora parasitas do gênero *Theileria* apresentem uma fase tecidual assim como aqueles do gênero *Cytauxzoon*, a fase tecidual de espécies de *Theileria* ocorre na forma de numerosos esquizontes dentro de linfócitos. Em contrapartida, no gênero *Cytauxzoon* um único esquizonte no interior de macrófagos é observado (MEINKOTH e KOCAN, 2005). A fase de piroplasma, por si só, é relativamente inócua e não causa sinais clínicos severos em felinos. Infecção somente com piroplasmas resulta em parasitemia assintomática. A fase esquizogônica, por sua vez, é responsável pelos sinais clínicos da doença (GLENN et al., 1983).

#### **2.4.2. Ciclo de Vida e Transmissão**

Os felinos adquirem o protozoário pela picada dos carrapatos vetores *Dermacentor variabilis* (BLOUIN et al., 1984; BLOUIN et al., 1987) e *Amblyomma americanum* (REICHARD et al., 2009; 2010), os quais transmitem esporozoítos de *C. felis* para o animal. Após a penetração, os esporozoítos invadem e se multiplicam em fagócitos mononucleares associados às células endoteliais, formando um único e grande esquizonte em cada célula. A ruptura dos esquizontes libera merozoítos, os quais por sua vez penetram nos eritrócitos. Uma vez dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por diversos ciclos de multiplicação. Embora seja sugerido que a eritrofagocitose de células infectadas possa perpetuar ciclos de esquizogonia, tal fato ainda não está confirmado (KIER et al., 1987). A patofisiologia da doença resulta da oclusão de pequenos vasos sanguíneos nos pulmões, baço e fígado promovida pela presença de macrófagos histiocíticos contendo grandes esquizontes (JACKSON et al., 2006; HABER et al., 2007).

Infecções experimentais em “bobcats” (*Lynx rufus*) e em gatos domésticos a partir de ninfas alimentadas em bobcats parasitêmicos mostraram que o carrapato *D. variabilis* é um vetor competente para *C. felis* (BLOUIN et al., 1984; BLOUIN et al.,

1987). Ainda, *C. felis* foi experimentalmente transmitido a partir de gatos domésticos parasitêmicos por meio de adultos de *A. americanum* (REICHARD et al., 2009; 2010).

### 2.4.3. Epizootiologia

Na América do Norte, “bobcats” são considerados os hospedeiros naturais do *C. felis*, observando-se uma alta prevalência do parasita nesta espécie de animal (SHOCK et al., 2011b). “Bobcats” são geralmente capazes de sobreviver à fase de esquizogonia da infecção (que neste caso é curta e limitada) e desenvolvem uma parasitemia persistente e subclínica (GLENN et al., 1982; BLOUIN et al., 1984, 1987; KOCAN e BLOUIN, 1985). Entretanto, em alguns casos, “bobcats” podem sucumbir à infecção por *C. felis* (NIETFELD e POLOCK, 2002). Em panteras da Flórida (*Puma concolor coroyi*) e pumas do Texas (*Puma concolor coroyi stanleyana*) também é verificada uma infecção subclínica (BUTT et al., 1991; ROTSTEIN et al., 1999; YABSLEY et al., 2006).

*Cytauxzoon manul*, um piroplasma filogeneticamente próximo de *C. felis*, tem sido encontrado em Palla’s cat (*Otocolobus manul*) da Mongólia (KETZ-RILEY et al., 2003; REICHARD et al., 2005) e lincos ibéricos (*Lynx pardinus*) da Espanha (LUACES et al., 2005; MILLÁN et al., 2007).

Durante muito tempo, felinos domésticos foram considerados hospedeiros finais do *C. felis*, nos quais se verificava uma forma fatal da doença (HOSKINS, 1991). Entretanto, a observação de parasitemia em felinos domésticos aparentemente saudáveis, sugeriu que estes animais podem funcionar como carreadores de uma forma subclínica da enfermidade e reservatórios adicionais do parasita (MEINKOTH et al., 2000; HABER et al., 2007).

### 2.4.4. Sinais clínicos

A doença geralmente segue um curso agudo e é caracterizada por sinais inespecíficos, tais como febre, letargia, anorexia, desidratação, icterícia, palidez de mucosas, dispnéia e esplenomegalia. O aparecimento de formas intra-eritrocíticas usualmente coincide com o desenvolvimento de febre. Parasitemias variando de 0,045% a 1,27% são observadas em gatos que sobrevivem à doença; felinos domésticos que sucumbem à enfermidade mostram parasitemia variando de 1% a 20%.

Vômitos, icterícia, linfonodos mesentéricos infartados e dificuldade respiratória são sinais observados em alguns casos. Hipotermia, decúbito e coma são observados na fase terminal da doença (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

*Cytauxzoon felis* foi incriminado como agente causal da morte de “bobcats” (NIETFELD e POLLOCK, 2002) e tigres (GARNER et al., 1996) nos Estados Unidos. Ainda, no Brasil, o encontro de macrófagos repletos de esquizontes em vários órgãos confirmou o diagnóstico de cytauxzoonose em dois leões mantidos em cativeiro no zoológico de Volta Redonda, estado do Rio de Janeiro (PEIXOTO et al., 2007).

#### **2.4.5. Achados laboratoriais**

As alterações laboratoriais mais consistentes são leucopenia (com granulação tóxica em neutrófilos) e trombocitopenia (decorrente do consumo aumentado de plaquetas). Anemia se desenvolve tardiamente no curso da infecção e torna-se acentuada nos estágios finais da doença. A anemia resulta, pelo menos em parte, da eritrofagocitose. Não há evidência de resposta por parte da medula óssea e tal fato pode ser resultado de um tempo insuficiente para uma resposta regenerativa ou supressão da medula óssea decorrente do cunho inflamatório da doença (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

Em relação à bioquímica sérica, os valores de bilirrubina total, glicose e alanina transaminase estão elevados, enquanto que albumina e potássio estão abaixo dos valores de referência (JACKSON et al., 2006).

#### **2.4.6. Achados de necropsia**

Felinos domésticos geralmente estão em boa condição nutricional devido ao rápido curso da doença. Palidez e icterícia são freqüentes achados de necropsia, decorrentes da anemia e bilirrubinemia, respectivamente. A maioria dos animais apresenta esplenomegalia, linfonodos infartados e pulmões edematosos e congestos. Hemorragias petequiais e equimóticas são encontradas em pulmões, bexiga, rins, coração e meninges. Vasos sanguíneos abdominais estão frequentemente distendidos devido à obstrução vascular (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

Histologicamente, macrófagos contendo esquizontes são encontrados no lúmen de veias e sinusóides de vários tecidos. Trombose e alterações consistentes com isquemia são verificadas principalmente em pulmões, baço e fígado. Coagulação intravascular disseminada é frequentemente vista em casos de cytauxzoonose (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

#### **2.4.7. Diagnóstico**

O diagnóstico é frequentemente baseado na presença de piroplasmas intra-eritrocíticos em esfregaços sanguíneos corados pelas várias variantes do Romanowski. O diagnóstico direto pode ser difícil devido à baixa parasitemia, qualidade variável de coloração do parasita e pela grande semelhança com *Mycoplasma haemofelis*. Durante os estágios iniciais da infecção, a detecção dos piroplasmas torna-se um tanto quanto difícil, fazendo-se necessário a realização de repetidos esfregaços sanguíneos. Esfregaços sanguíneos negativos podem continuar negativos, uma vez que a doença clínica causada pela oclusão vascular causada pelo estágio tecidual do parasita frequentemente precede o aparecimento de piroplasmas eritrocíticos. O exame de aspirados do fígado, baço e rins na tentativa de detectar esquizontes pode ser necessário para confirmar o diagnóstico ou favorecer um diagnóstico na fase inicial da doença (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

Artefatos (precipitado de corante e corpúsculos de Howell-Jolly) podem ser confundidos com o parasita, uma vez que este último é extremamente pequeno e pleomórfico (1-3 $\mu$ m de diâmetro). A forma em anel com um núcleo periférico (com a área central mais clara que o restante do eritrócito) é a mais frequentemente encontrada em esfregaços sanguíneos. Formas em alfinete (com dois núcleos em direções opostas), lineares e em vírgula também são encontradas (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

Testes moleculares (PCR) são altamente sensíveis e específicos (BIRKENHEUER et al., 2006). Testes sorológicos não são ainda disponíveis comercialmente para o diagnóstico da cytauxzoonose (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009).

#### **2.4.8. Tratamento**

Os tratamentos empregados para cytauxzoonose têm se mostrado insatisfatórios no que diz respeito à alta taxa de mortalidade verificada. Combinações de antibióticos (clindamicina, penicilina, enrofloxacina e doxiciclina) com drogas anti-protozoários (diproprionato de imidocarb, aceturato de dimiazeno, parvaquone e atovaquone) têm sido utilizadas, porém com resultados insatisfatórios (MEINKOTH e KOCAN, 2005; HOLMAN e SNOWDEN, 2009). Drogas anti-theilerídeos (parvaquone e buparvaquone) não surtiram efeito no tratamento de gatos infectados com *Cytauxzoon felis* (MOTZEL et al., 1990).

A despeito da droga utilizada, terapia de suporte (fluidoterapia e administração de anticoagulantes a fim de prevenir a coagulação intravascular disseminada) é um fator comum entre os animais sobreviventes à enfermidade. Porém, verificou-se que felinos domésticos tratados mantêm-se PCR positivos após a remissão dos sinais clínicos e, possivelmente, tornam-se reservatórios da infecção (MEINKOTH et al., 2000).

Recentemente, a eficácia de atovaquone com azitromicina foi comparada com diproprionato de imidocarb no tratamento de felinos domésticos com cytauxzoonose. Embora a porcentagem de sobrevivência de felinos domésticos tratados com o primeiro protocolo terapêutico tenha sido maior que aquela verificada em gatos tratados com imidocarb, a taxa de mortalidade observada permaneceu alta, independente do protocolo terapêutico utilizado (COHN et al., 2011).

### **2.5. Infecções por *Hepatozoon* sp.**

#### **2.5.1. Agentes etiológicos**

O gênero *Hepatozoon* pertence ao filo Apicomplexa, família Hepatozoidae, sendo composto por mais de 300 espécies. Canídeos podem ser parasitados por *H. canis* ou *H. americanum* (BANETH et al., 2003). Felídeos, por sua vez, podem ser parasitados por *H. canis* (RUBINI et al., 2006; O'DWYER, 2011) e *H. felis* (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; METZGER et al., 2008; DE BORTOLI et al., 2011).

### 2.5.2. Transmissão e Ciclo Biológico

Parasitas do gênero *Hepatozoon* requerem dois hospedeiros para completarem seu ciclo de vida. Carrapatos são os hospedeiros definitivos nos quais a reprodução sexuada ocorre. Cães, gatos e outras espécies de vertebrados atuam como hospedeiros intermediários, nos quais a reprodução assexuada ocorre (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Durante o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados, os carrapatos ingerem leucócitos contendo gametócitos de *Hepatozoon*. Após deixarem os glóbulos brancos, os gametas formarão os gametas masculinos e femininos. O zigoto resultante se desenvolve em oocisto no intestino do carrapato assim que o artrópode sofre a muda. O carrapato adulto contém inúmeros oocistos maduros dentro da hemocele. O hospedeiro vertebrado se infecta ao ingerir um carrapato adulto contendo oocistos. No trato intestinal do hospedeiro vertebrado, os esporozoítos são liberados dos oocistos, atravessam a parede intestinal e, por meio da circulação sanguínea, são transportados até os tecidos hemolinfáticos (no caso de *H. canis*), incluindo baço, medula óssea e linfonodos, ou até a musculatura esquelética ou cardíaca (no caso de *H. americanum*), onde ocorrerá a merogonia. *Hepatozoon americanum* se desenvolve entre os miócitos dentro de uma célula hospedeira. Camadas de mucopolissacarídeos são depositadas em torno da célula hospedeira, formando um cisto em forma de “escamas de cebola”. A merogonia se dá no interior destes cistos e, após maturação, ocorre ruptura do cisto com liberação dos merozoítos. Tal processo incita uma resposta inflamatória severa, com a chegada de neutrófilos e monócitos, formando um piogranuloma. Muitas células inflamatórias tornam-se infectadas com um único zoíto. No piogranuloma ocorre angiogênese e, por meio desta rede vascular, leucócitos parasitados podem chegar a outros sítios a fim de continuar a reprodução assexuada, ou ainda, gametócitos são formados no interior destas células, fechando o ciclo de vida quando alguma espécie de carrapato realiza repasto sanguíneo. Para *H. americanum*, o ciclo de vida no carrapato dura 42 dias (até a formação de oocistos maduros); no hospedeiro vertebrado, o ciclo tem duração de 32 dias (ingestão de esporozoítos até a formação de gametócitos). Nos Estados Unidos, *Amblyomma maculatum* é o vetor da hepatozoonose canina causada

por *H. americanum* (EWING et al., 2002). Diferentemente, o meronte de *H. canis* é formado por merozoítos alongados dispostos em círculo ao redor de uma área central clara, formando um meronte em forma de “raios de roda” (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

O principal vetor do *H. canis* é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é encontrado em regiões temperadas e subtropicais em todo o mundo (BANETH et al., 2001). Tal fato torna a distribuição do *H. canis* cosmopolita. Transmissão transestadial, mas não transovariana tem sido documentada nesta espécie de carrapato. *Amblyomma ovale* mostrou ser um vetor competente na transmissão de *H. canis* (FORLANO et al., 2005; RUBINI et al., 2009). Recentemente, o encontro de oocistos de *H. canis* na hemocele de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* levantou a suspeita da capacidade vetorial desta espécie de carrapato para *H. canis* (DE MIRANDA et al., 2011). *Hepatozoon americanum*, por sua vez, é encontrado na região dos EUA próxima à Costa do Golfo, sendo transmitido pela ingestão do carrapato *Amblyomma maculatum* (“carrapato da Costa do Golfo”), o qual foi encontrado com oocistos do protozoário (VINCENT-JOHNSON et al., 2003; BANETH et al., 2003; LITTLE et al., 2009; EWING et al., 2003).

A ingestão de esporozoítos de *H. americanum* por roedores promoveu o desenvolvimento de cistozoítos nos tecidos musculares destes animais (JOHNSON et al., 2007). Quando cães ingeriram musculatura de roedores contendo cistozoítos, observou-se doença clínica característica de hepatozoonose por *H. americanum* (JOHNSON et al., 2009), demonstrando que uma outra importante via de transmissão desta enfermidade é por meio da predação (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Infecção transplacentária tem sido documentada em casos de infecção por *H. canis* (MURATA et al., 1993), porém para *H. americanum* tal forma de transmissão não foi descrita até o momento.

### 2.5.3. Epizootiologia da hepatozoonose em carnívoros selvagens

Gametócitos e esquizontes de *Hepatozoon sp.* foram detectados em hienas, chacais, leões, chitas e leopardos no Parque Nacional Kruger, África do Sul. Esporogonia foi observada em *Rhipicephalus simus* e *R. sanguineus*, coletados respectivamente de uma hiena e de um chacal infectados (MCCULLY et al., 1975).

Esquizontes de *Hepatozoon sp.* foram encontrados no miocárdio de um coiote (*Canis latrans*) no estado do Texas, EUA (DAVIS et al., 1978). Ainda, no Texas, na região da Costa do Golfo, gametócitos de *Hepatozoon sp.* foram detectados em esfregaços sanguíneos de doze coiotes, três bobcats (*Lynx rufus*) e seis jaguatiricas (*Felis pardalis*) (MERCER et al., 1998).

Em Portugal, a partir de uma amostra de 301 raposas (*Vulpes vulpes silacea*), 148 (48%) estavam infectadas com *Hepatozoon sp.* Gametócitos representaram o estágio mais frequentemente encontrado e foram detectados em praticamente todos os órgãos, exceto na medula óssea, onde predominaram esquizontes (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1988).

Gametócitos de *Hepatozoon sp.* foram detectados em esfregaços sanguíneos de 23 leões (*Panthera leo*) e oito chitas (*Acinonyx jubatus*) do Parque Nacional de Serengeti e Área de Conservação de Ngorongoro, na Tanzânia (AVERBECK et al., 1990).

Dentre uma amostra de cães selvagens (*Lycaon pictus*) do Parque Nacional Kruger, na África do Sul, gametócitos de *Hepatozoon sp.* foram encontrados em 26 (93%) animais (VAN HEERDEN et al., 1995).

Em 1997, gametócitos de *H. canis* foram encontrados parasitando neutrófilos em esfregaços sanguíneos de um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), na região de Botucatu, SP. O animal apresentava anemia, eosinofilia, monocitose e anemia moderada (ALENCAR et al., 1997).

Infecção por *H. americanum* foi diagnosticada por meio de biópsias musculares em oito coiotes de vida livre, no estado de Oklahoma, EUA (KOCAN et al., 2000a). Ainda, quando filhotes de coiotes foram experimentalmente infectados com oocistos de *H. americanum*, desenvolveram doença clínica inclusive com lesão periosteal. Ninfas de *A. maculatum* adquiriram a infecção ao serem alimentadas nestes animais (KOCAN et

al., 2000a). Tanto coiotes adultos quanto jovens são igualmente susceptíveis à infecção por *H. americanum* isolado a partir de cães ou coiotes infectados (GARRET et al., 2005). A idade dos coiotes e o número de oocistos ingeridos durante a infecção pode influenciar a morbidade e mortalidade da enfermidade. A despeito desta observação, tanto coiotes adultos quanto jovens são possíveis reservatórios de *H. americanum* (GARRET et al., 2005).

Gametócitos de *H. canis* foram encontrados em apenas um chacal (*Canis aureus*) em Israel, dentre uma amostragem de 46 animais (SHAMIR et al., 2001).

*Hepatozoon sp.* foi detectado em dois (0,7%) de 301 cães selvagens (*Lycaon pictus*) na África do Sul (MATJILA et al., 2008).

No Japão, infecção por *Hepatozoon sp.* foi detectada em 56,7% (17/30) e 14,3% (6/42) entre amostras de gatos selvagem de Iriomote (*Felis iriomotensis*) e gatos leopardo de Tsushima (*Felis bengalensis euphilura*), respectivamente. O órgão mais frequentemente parasitado foi o coração (KUBO et al., 2006). Recentemente, gametócitos e DNA de *H. felis* foram detectados em um gato de Iriomote (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*), no Japão (SAKUMA et al., 2011).

No Rio Grande do Sul, DNA de *Hepatozoon sp.* (isolado “Curupira 2”), filogeneticamente próximo de *H. americanum*, foi detectado em um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. Ainda, nove canídeos selvagens estavam parasitados por *H. canis*. Dois genótipos foram caracterizados: “Curupira 1” em 5 raposinhas (*Pseudalopex gymnocercus*) e “Curupira 3” em 4 cachorros-do-mato (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

No Brasil, DNA de *Hepatozoon sp.*, filogeneticamente próximo de *H. felis*, foi detectado em duas jaguatiricas e em um gato-do-mato-pequeno no Ceará e em duas jaguatiricas no Maranhão (METZGER et al., 2008).

Na Venezuela, DNA de *H. canis* foi detectado em uma onça-pintada (*Panthera onca*) (CRIADO-FORNELIO et al., 2009).

Na Tailândia, DNA de *Hepatozoon sp.* filogeneticamente próximo de *Hepatozoon sp.* encontrado em sapos, foi detectado em dois gatos selvagens de cabeça-chata (*Prionailurus planiceps*) (SALAKIJ et al., 2008).

Por meio de um programa de monitoramento de hienas (*Crocuta crocuta*) na Tanzânia, DNA de *Hepatozoon sp.*, filogeneticamente próximo de *H. felis* encontrado em gatos da Espanha, foi detectado em 11 animais. Duas hienas apresentavam sinais de ataxia, letargia, descarga ocular, mímica de vômito e respiração laboriosa. Pneumonia intersticial e cistos pulmonares contendo os parasitas foram alterações histopatológicas descritas em oito animais infectados (EAST et al., 2008).

*Hepatozoon canis* foi detectado em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) amostradas em Guadalajara e Burgos, Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2003a,b; GIMENEZ et al., 2009).

Utilizando métodos moleculares, *H. canis* foi encontrado em 23% (44/191) de raposas (*Vulpes vulpes*) da Croácia (Dezdek et al., 2010). Ainda neste estudo, *Hepatozoon sp.*, filogeneticamente próximo a uma espécie de *Hepatozoon* encontrado em roedores, foi detectado em duas raposas, sugerindo a predação de roedores como possível via de transmissão nestes animais (DEZDEK et al., 2010).

Na Itália, DNA de *H. canis* foi detectado em 16/119 (13,4%) raposas (*Vulpes vulpes*) (GABRIELLI et al., 2010).

Na Coreia, *Hepatozoon sp.*, filogeneticamente próximo de isolados de *H. felis* do Brasil e Espanha, foi detectado em gatos-leopardo (*Prionailurus bengalensis*) (KUBO et al., 2010).

#### **2.5.4. Sinais Clínicos**

A infecção por *H. canis* varia desde formas assintomáticas em cães aparentemente saudáveis até doença clínica severa potencialmente fatal, a qual é caracterizada por extrema letargia, caquexia e anemia. A forma mais comum da enfermidade é a moderada, usualmente associada com parasitemia de baixa amplitude (1-5% dos neutrófilos infectados). A forma severa da doença é associada com alta parasitemia (aproximadamente 100% dos neutrófilos de sangue periférico infectados). Imunossupressão induzida por agente infeccioso ou quimioterapia pode influenciar a patogênese de uma infecção por *H. canis* ou reativar uma infecção pré-existente (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Em contraste com uma forma de doença geralmente subclínica observada em cães infectados com *H. canis*, infecções com *H. americanum* são caracterizadas por uma forma frequentemente fatal e debilitante da doença. As manifestações mais comuns da hepatozoonose canina por *H. americanum* incluem febre, dor generalizada, atrofia muscular, claudicação, edema de membros, descarga ocular mucopurulenta, perda de peso, depressão, fraqueza e relutância em se levantar, causados principalmente por cistos merogônicos na musculatura esquelética e lesões proliferativas induzidas pelo parasita. Rigidez no movimento e decúbito são frequentemente encontrados em cães infectados. Proliferação periosteal simétrica ocorre em casos severos e envolve inicialmente a porção proximal dos membros, podendo também envolver elementos do esqueleto axial e ossos chatos. Sem tratamento, a morte geralmente ocorre dentro de 12 meses pós-infecção (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Embora o *Hepatozoon sp.* encontrado em felinos seja incriminado como um agente de baixa virulência, a hepatozoonose felina é caracterizada por anorexia, letargia, perda de peso, descarga ocular e icterícia (BANETH et al. 1998; PEREZ et al. 2004). Uma associação entre *Hepatozoon sp.* e retrovírus (FIV, FeLV) tem sido reportada (BANETH et al., 1998).

#### **2.5.5. Achados laboratoriais**

Em infecções por *H. canis*, a alta parasitemia é geralmente acompanhada por neutrofilia de grau elevado (150000 neutrófilos/ $\mu$ L de sangue). Neste último caso, parasitas são encontrados em grande quantidade na circulação (>50000 gametócitos/ $\mu$ L de sangue) (BANETH et al., 2003; EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Infecções por *H. americanum* são caracterizadas por marcada leucocitose, variando de 20000 a 200000 leucócitos/ $\mu$ L de sangue, geralmente acompanhada por baixa parasitemia (usualmente não excedendo 0,1% dos leucócitos circulantes (EWING e PANCIERA, 2003; PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON et al., 2003; LITTLE et al., 2009).

Alterações bioquímicas incluem elevação da fosfatase alcalina, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Anemia normocítica e normocrômica não-regenerativa é comum, decorrente de inflamação crônica (LAPPIN, 2010).

Na hepatozoonose felina, níveis elevados de enzimas musculares (creatina quinase e lactato desidrogenase) têm sido reportados (BANETH et al. 1998; PEREZ et al. 2004).

#### **2.5.6. Achados patológicos**

Na infecção por *H. americanum*, podem ser observados palidez e atrofia da muscular esquelética, particularmente nos músculos temporais, órgãos linfóides moderadamente aumentados, edema subcutâneo na porção distal dos membros, proliferação periosteal óssea disseminada e simétrica, piogranulomas (contendo o meronte em forma de “cascas de cebola”) na musculatura, inflamação da musculatura esquelética e cardíaca, glomerulopatia membranosa, amiloidose renal, inflamação linfoplasmocítica das membranas sinoviais (PANCIERA e EWING, 2003; VINCENT-JOHNSON, 2003).

#### **2.5.7. Diagnóstico**

A infecção por *H. canis* é frequentemente diagnosticada pela visualização de gametócitos (11 µm x 4 µm com formato elipsoidal) em neutrófilos nos esfregaços sanguíneos corados por Romanowsky. Nos tecidos, o meronte é caracterizado pelo seu formato de “raios de roda” (BANETH et al., 2003).

Por outro lado, gametócitos (8,8 µm x 3,9 µm) de *H. americanum* são raramente encontrados em esfregaços sanguíneos corados de cães infectados e, quando presentes, são encontrados em menos de 0,1% dos neutrófilos e monócitos. Gametócitos podem sair das células rapidamente após a colheita de sangue, deixando uma cápsula vazia que é de difícil identificação. O exame citológico de papa leucocitária aumenta as chances de se encontrarem gametócitos (VINCENT-JONHSON, 2003). A biópsia muscular (geralmente dos músculos bíceps femorale semitendinoso) busca a identificação de cistos, merontes e piogranulomas, contendo neutrófilos e monócitos parasitados por *H. americanum*.

Técnicas sorológicas (ELISA) (FISHMAN et al., 2004; MATHEWS et al., 2001) e moleculares (INOKUMA et al., 2002) têm sido utilizadas no diagnóstico da infecção por *Hepatozoon sp.*

#### **2.5.8. Tratamento**

Até o momento, não existe protocolo terapêutico que seja capaz de eliminar *H. canis* ou *H. americanum* dos tecidos. Entretanto, a doença clínica se resolve rapidamente com um protocolo terapêutico incluindo várias drogas. Para *H. americanum*, a combinação de trimetoprim-sulfadiazina (15mg/kg PO, BID), pirimetamina (0,25 mg/kg PO, SID) e clindamicina (10mg/kg, PO, TID) durante 14 dias é empregado durante a fase aguda da doença. O uso de decoquinato (10-20 mg/kg BID) administrado juntamente com a ração e durante um longo período de tempo evita a recorrência clínica da doença e prolonga o tempo de sobrevivência. Para *H. canis*, a droga de escolha é o dipropionato de imidocarb (5-6 mg/kg, IM ou SC, SID ou BID, durante 14 dias). A administração de anti-inflamatórios não esteroidais pode diminuir o desconforto dos animais, porém seu uso deve ser evitado, tendo em vista que cães podem manifestar uma exacerbação da doença clínica (LAPPIN, 2010).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo pesquisar a presença de infecção ou exposição por agentes Anaplasmataceae (*Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *N. helminthoeca*, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum*), Rickettsiaceae (*Rickettsia* sp. e *Orientia tsutsugamushi*), *Babesia* sp., *Cytauxzoon* sp., micoplasmas hemotróficos (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Candidatus M. turicensis*, *M. haemocanis* e *Candidatus M. haematoparvum*) e *Hepatozoon* sp. em carnívoros selvagens mantidos em cativeiro, utilizando métodos sorológicos e moleculares.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar a detecção direta dos hemoparasitas por meio de esfregaços sangüíneos corados a partir de punção de vaso capilar periférico de ponta de orelha de canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro;
- Investigar a presença de ectoparasitas nos animais sob estudo;
- Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii* e anti-*B. canis vogeli* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros dos animais;
- Detectar o DNA de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *N. helminthoeca*, *Anaplasma platys*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* sp., *Cytauxzoon* sp. e *Hepatozoon* sp., *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Candidatus M. turicensis*, *M. haemocanis* e *Candidatus M. haematoparvum* (para canídeos) em amostras de sangue total pela Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCR);
- Padronizar uma multiplex PCR em tempo real para amplificação do DNA dos gêneros *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp.;

- Detectar o DNA de agentes da Família Rickettsiaceae, filogeneticamente relacionados à família Anaplasmataceae, por meio de uma multiplex PCR em tempo real para os agentes do grupo da *Rickettsia rickettsii* (“Grupo da Febre Maculosa”), *Rickettsia typhi* (“Grupo do Tifo”) e *Orientia tsutsugamushi*;
- Detectar o DNA de *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis* por meio de uma multiplex PCR em tempo real específica para os agentes em questão;
- Clonar e seqüenciar as amostras positivas na PCR para validação das mesmas e compará-las com aquelas depositadas no GenBank;
- Caracterizar molecularmente os isolados por meio da construção de árvores filogenéticas com base nas seqüências obtidas;
- Verificar a presença de associação entre retrovírus e hemoparasitas em amostras de sangue de felídeos selvagens.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo

Foram amostrados 167 felídeos selvagens mantidos em cativeiro (Licença IBAMA número 02027.002943/2005; Licença IBAMA número 15901-1) das seguintes espécies: *Puma concolor* (suçuarana), *Leopardus pardalis* (jaguaririca), *Puma yagouaroundi* (gato-mourisco), *Leopardus wiedii* (gato-maracajá), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), *Oncifelis colocolo* (gato-palheiro), *Panthera onca* (onça-pintada), *Panthera tigris* (tigre), *Panthera leo* (leão), *Caracal caracal* (caracal), *Leptailurus serval* (serval), *Prionailurus viverrinus* (gato-pescador). Adicionalmente, foram colhidas amostras de sangue de 100 de canídeos selvagens das seguintes espécies: *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Speothos venaticus* (cachorro-vinagre), *Pseudalopex vetulus* (raposa-do-campo), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Canis lupus* (lobo-europeu) e de um viverrídeo (*Genetta genetta*) (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Número, espécies e respectivas instituições de origem dos canídeos e felídeos selvagens amostrados.

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Localização (número de animais)</b>	<b>Total</b>
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	AMC (23), Rp (2), Am (2), IS (2), So (1), Br (3), Bau (3), Ita (2), Mg (1), Pir (4)	43
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	AMC (8), Cps (1), Rp (2), Am (1), IS (2), So (14), SC (1), Br (3), Ita (1), Pir (3), Cat (1), NO (2)	39
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato maracajá	AMC (2), Am (2)	4
<i>Oncifelis colocolo</i>	Gato palheiro	AMC (3), So (1)	4
<i>Panthera onca</i>	Onça	AMC (2), Ped (4), Cps (1), Rp (2), Am (1), So (1), Br (1), Bau (1), SP (1)	14
<i>Puma concolor</i>	Suçuarana	AMC (4), Ped (2), Rp (2), Am (2), So (3), Br (3), Cat (2)	18
<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato mourisco	AMC (6), Am (2), IS (4), So (4), SC(2), Bau (3), Ita (3), Pir (1)	25
<i>Panthera tigris</i>	Tigre	So (2), Ita (2), SP (2)	6
<i>Panthera pardus</i>	Leopardo	SP(1)	1
<i>Caracal caracal</i>	Caracal	SP (1)	1
<i>Leptailurus serval</i>	Serval	SP (1)	1
<i>Panthera leo</i>	Leão	Rp (1), Am (1), So (1), Bau (3), SP (4)	10
<i>Prionailurus viverrinus</i>	Gato-pescador	SP (1)	1
<i>Speothos venaticus</i>	Cachorro-vinagre	Am (8), IS (1), Pi (6), SP (8), NO (1), Cui (3)	27
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	Rp (9), Am (3), Ara (6), IS (3), So (1), Br (4), Bau (1), Ita (1), Pir (3), Cat (6), Le (1)	40
<i>Cerdocyon brachyurus</i>	Lobo guará	Rp (2), Am (1), Ara (1), IS (2), So (1), SC (2), Ita (3), Mg (3), SP (3), Cat (1), NO (3)	22
<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposinha	Rp (1), Am (2), Ara (3), IS (1), So (1)	8
<i>Canis lupus</i>	Lobo-europeu	SP (3)	3
<i>Genetta genetta</i>	Geneta	Ita (1)	1

AMC – Associação Mata Ciliar, Jundiá, São Paulo; SC – São Carlos Zoo, São Paulo; NO – Nova Odessa Zoo, São Paulo; Ped – Pedreira Zoo, São Paulo; Br – Brasília Zoo, Federal District; Le – Leme Zoo, São Paulo; Cps – Campinas Zoo, São Paulo; Bau – Bauru Zoo, São Paulo; Cui – Cuiabá Zoo, Mato Grosso; Cat – Catanduva Zoo, São Paulo; Rp – Ribeirão Preto, São Paulo; Ita – Itatiba Zoo, São Paulo; Am – Americana Zoo, São Paulo; Mg – Mogi Mirim Zoo, São Paulo; Ara – Araçatuba Zoo, São Paulo; Pir – Piracicaba Zoo, São Paulo; IS – Ilha Solteira Zoo, São Paulo; SP – São Paulo, São Paulo.

## 4.2. Colheita das amostras

### 4.2.1. Imobilização física e química

A fim de minimizar o estresse no momento da contenção, foram realizadas imobilizações de natureza física e química, de acordo com a idade, tamanho e espécie do animal. Os materiais usados para a contenção física foram luvas de couro, puçás e jaula de prensa. Para a contenção farmacológica, foram utilizados Cloridrato de Quetamina (Cetamin – Laboratórios Calier®) associado ao Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratórios Calier®), ou Tiletamina associada ao Zolazepam (5mg/kg) de acordo com o protocolo utilizado pelo zoológico no qual a colheita era realizada (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Dosagens anestésicas utilizadas para a imobilização química de felídeos e canídeos selvagens mantidos em cativeiro.

ESPÉCIE DE CARNÍVORO SELVAGEM	DROGAS E DOSES (mg/kg)
<i>Leopardus tigrinus</i> , <i>Leopardus wiedii</i> , <i>Oncifelis colocolo</i> , <i>Puma yagouaroundi</i> , <i>Caracal caracal</i> , <i>Lepailurus serval</i> , <i>Prionailurus viverrinus</i>	Cloridrato de quetamina (10) + Cloridrato de xilazina (2)
<i>Leopardus pardalis</i>	Cloridrato de quetamina (12) + Cloridrato de xilazina (1)
<i>Panthera onca</i> , <i>Puma concolor</i> , <i>Panthera tigris</i> , <i>Panthera leo</i>	Cloridrato de quetamina (10) + Cloridrato de xilazina (1)
<i>Cerdocyon thous</i> , <i>Chrysocyon brachyurus</i> , <i>Speothos venaticus</i> , <i>Pseudalopex vetulus</i> , <i>Canis lupus</i>	Tiletamina + Zolazepam (5mg/kg)

### 4.2.2. Obtenção das amostras de sangue e soro

Para a obtenção de sangue, os animais (com exceção de onças-pintadas, suçuaranas, tigres) foram contidos primeiramente com o auxílio de puçás e em seguida colocados em caixas de contenção/prensa para facilitar o manejo e posterior contenção farmacológica. Para a contenção farmacológica de felinos de grande porte (onça-pintadas, suçuaranas e tigres), foram utilizados dardos em zarabatanas contendo a preparação anestésica. A colheita foi realizada por meio de venopunção, utilizando-se

agulhas e seringas esterilizadas. A veia de escolha para colheita bem como a quantidade de sangue a ser colhido e tamanho da agulha variou de acordo com a espécie, idade e massa corporal do animal. Parte do sangue foi depositado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e a outra parte em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. As amostras de sangue e soro foram aliquotizadas em microtubos de 1,5 mL esterilizados e mantidos a -20°C, para posterior uso nos experimentos com a PCR e RIFI, respectivamente. Os animais foram investigados quanto à presença de ectoparasitas no momento da colheita das amostras.

#### **4.3. Confeção de esfregaços sangüíneos**

Colheu-se sangue periférico a partir da punção de capilar marginal de ponta de orelha dos animais para confecção de esfregaços sangüíneos finos, os quais foram fixados pelo Metanol (Synth<sup>®</sup>, São Paulo, SP) durante 3 minutos e corados pelo Giemsa (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) durante 30 minutos. Sob microscopia de luz (x1000), buscou-se a presença de corpúsculos de inclusão ou de mórulas sugestivos de *Ehrlichia sp.*, *Anaplasma sp.* e *Neorickettsia* e de gametócitos de *Hepatozoon sp.* Em hemácias, foi realizada a busca por estruturas sugestivas de *Mycoplasma sp.* e piroplasmas característicos de *Babesia sp.* e *Cytauxzoon sp.*

#### **4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

##### **4.4.1. Reação de Imunofluorescência Indireta para agentes Anaplasmataceae**

###### **4.3.1.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *E. canis***

O antígeno de *E. canis* usado para confecção de lâminas de RIFI foi obtido a partir de cultura de células DH82 (derivadas de histiocitoma canino) infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO<sup>2</sup> em 1993 a partir de um cão, fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença (AGUIAR et al., 2007).

---

<sup>2</sup> MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1993.

#### **4.4.1.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia risticii***

As amostras de soros foram diluídas a 1:64 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço das lâminas contendo antígenos de *E. canis*, *E. chaffeensis* (Fuller Laboratories<sup>®</sup>, Fullerton, Califórnia, Estados Unidos), *A. phagocytophilum* (VMRD, Pullman, Washington, Estados Unidos) e *N. risticii* (VMRD, Pullman, Washington, Estados Unidos). Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *E. canis* e soros de cervos positivos e negativos para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2, secas e a cada uma adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de gato e anti-IgG de cão, marcados pelo isoticianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão e anti-IgG de cervo para os controles positivos e negativos), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). As lâminas foram então incubadas por mais 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (RISTIC et al., 1972).

#### **4.4.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia canis vogeli***

##### **4.4.2.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *Babesia canis vogeli***

---

O antígeno proveio da inoculação, em cães, de uma amostra de *B. canis vogeli*, isolada por MACHADO<sup>3</sup> (1999), a partir de um cão atendido no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP Jaboticabal.

Previamente à inoculação, realizou-se a PCR com oligonucleotídeos iniciadores para *Babesia sp.* cujo produto foi clivado com as endonucleases de restrição *Hinf I* e *Taq I*, obtendo-se assim um padrão de clivagem compatível com *B. vogeli* (FURUTA et al., 2009).

Dois cães, com aproximadamente três meses de idade, mantidos livres de ectoparasitas através do isolamento e utilização periódica de Frontline (Merial®, Campinas, São Paulo), vacinados contra as principais doenças infecciosas caninas por meio de vacinas comerciais (FortDodge®, Campinas, São Paulo) e desverminados (Bayer®, São Paulo, São Paulo) foram mantidos no canil do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à esplenectomia com o objetivo de baixar a resistência imunológica e facilitar a visualização dos parasitas nos esfregaços sangüíneos. Quatro dias após o procedimento cirúrgico, aproximadamente 8 mL de sangue (mantido criopreservado em igual volume com dimetilsulfóxido [DMSO 10%] em nitrogênio líquido) de um cão parasitado com *B. canis*, foi descongelado em banho-maria a 37°C. Procedeu-se então, a inoculação experimental de um dos cães com o sangue parasitado através da via endovenosa.

O animal foi então submetido a avaliações diárias da sua condição física, temperatura retal e avaliação da parasitemia por meio de punções de sangue capilar obtido da ponta de orelha, três vezes ao dia, até se obter a parasitemia desejada (25%), no 5º dia pós-infecção.

A pesquisa por parasitas era feita nos esfregaços sangüíneos finos corados com Giemsa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Uma vez obtida a parasitemia desejada, colheu-se cerca de 30 mL de sangue parasitado em frascos com EDTA sódico a 7,5% como anticoagulante, procedendo-se à lavagem das hemácias com solução salina tamponada por 3 vezes. A partir da papa de hemácias, foram

---

<sup>3</sup> MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1999.

realizados esfregaços sangüíneos finos em lâminas previamente lavadas e desengorduradas em álcool/éter (70%/30%), as quais foram utilizadas como antígeno para a realização da RIFI para *B. canis*. Após secarem em temperatura ambiente, foram embrulhadas (individualmente) em papel absorvente extrafino, envoltas em papel alumínio e acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado a -20°C até o momento do uso. Parte do sangue do animal parasitado (20 mL) foi transferido para o outro cão esplectomizado, o qual apresentou pico de parasitemia 3 dias após a inoculação do mesmo. Colheram-se 10 mL de sangue parasitado para confecção de novas lâminas para RIFI, para preservação com DMSO em nitrogênio (-196°C) líquido e para extração de DNA (controle positivo para as reações de PCR). Após a colheita, os animais foram submetidos à fluidoterapia para o restabelecimento da volemia e administrou-se dipropionato de imidocarb (5,0 mg/kg), por via subcutânea, para o tratamento da babesiose.

#### **4.4.2.2. Descrição da Reação**

As amostras de soros foram diluídas a 1:40 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno de *B. canis*. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *B. vogeli*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 45 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2, secas e a cada uma adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de gato e anti-IgG de cão para as amostras testes, marcados pelo isotocianato de fluoresceína, e anti-IgG de cão para os controles positivos e negativos), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). As lâminas foram então incubadas por mais 45 minutos a 37°C, em câmara úmida. Foram consideradas positivas as reações em que toda a periferia do parasita apresentou fluorescência, a partir da diluição de 1:40, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (FURUTA et al., 2009).

#### **4.5. Detecção de anticorpos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e do antígeno p27 de FeLV (vírus da leucemia felina)**

A pesquisa de antígeno de FeLV e de anticorpos para FIV no soro dos felídeos selvagens foi realizada com o kit comercial ELISA Snap-Combo® FIV-FeLV (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, Estados Unidos) conforme as instruções do fabricante.

#### **4.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

##### **4.6.1. Extração de DNA**

A extração de DNA de sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, Valencia, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C para realização da PCR.

Para as pulgas coletadas, procedeu-se a uma trituração em solução salina de fosfato tamponada, seguida de centrifugação a baixa velocidade (300xg) durante 5 minutos para promover a remoção de debris. O sobrenadante foi então utilizado como amostra para extração de DNA, utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Valencia, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C para realização da PCR.

##### **4.6.2. Reações de Amplificação para agentes da Ordem Rickettsiales**

###### **4.6.2.1. Reações de Amplificação para agentes da Família Anaplasmataceae baseada no gene *16S rRNA***

Nas reações de PCR foram utilizados 5 ou 10 µL de DNA amostra. Os oligonucleotídeos iniciadores e as seqüências térmicas utilizados na PCR para cada agente estão representados nos **Tabelas 3 e 4**, respectivamente. Na reação foram utilizados 1,25U Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®, Carlsbad,

California, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, California, Estados Unidos) q.s.p. 25 µL. Nas reações de nested PCR, utilizou-se 1µL do produto amplificado na primeira reação de PCR. Amostras de DNA controle-positivos de *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii* e *N. helminthoeca* foram gentilmente cedidos pelo Prof. John Stephen Dumler (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, Estados Unidos). O DNA controle positivo de *E. canis* foi obtido a partir de células DH82 infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO<sup>4</sup> em 1993 a partir de um cão atendido na rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007). O DNA controle positivo de *A. platys* foi obtido a partir de cães anaplasmoze atendidos na rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP Jaboticabal (DAGNONE et al., 2009).

---

<sup>4</sup> MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1993.

**Tabela 3.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e nested PCR, tamanhos dos amplicómeros e referências utilizadas para detecção molecular de agentes da Família Anaplasmataceae baseadas no gene 16S rRNA.

Agente	Seqüência do oligonucleotídeo	Tamanho do amplicómero (pb)	Referência
<i>Ehrlichia spp.</i>			
- ECC	5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'	478	MURPHY et al., 1998
- ECB	5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'		
Nested <i>E. canis</i>			
- ECAN-5	5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -3'	358	MURPHY et al., 1998
-HE3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT-3'		
Nested <i>E. chaffeensis</i>			
- CHAFF	5'- CAA TTGCTTATAACCTGGTTATAAAT-3'	410	KOCAN et al., 2000b
-GAIUR	5'-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3'		
Nested <i>E. ewingii</i>			
- 18F	5'- AGTTTGATCATGGCTCAG-3'	1440	PERSING, 1996
- 1448R	5'- CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3'		
- Ewingii	5'-CAATTCCTAAATAGTCTCTGACTATT-3'	412	
- GAIUR	5'-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3'		
<i>Anaplasma platys</i>			
- Platys F	5'- AAGTGCAACGGATTTTTGTC-3'	504	INOKUMA et al., 2001b
- Platys-R	5'- CTTTAACTTACCGAACC-3		
<i>A. phagocytophilum</i>			
- gE3a	5'- CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	932	MASSUNG et al., 1998
- gE10R	5'- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC -3'		
- gE2	5'- GGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGG-3'	546	
- gE9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'		
<i>N. risticii</i>			
- ER3-F	5'- ATTTGAGAGTTTGATCCTGG-3'	599	CHAE et al., 2003
- ER2-R	5'- GTTTTAAATGCAGTTCTTGG-3'		
- ER3a-F	5'- CTAGCGGTAGGCTTAAC-3'	529	
- ER2a-R	5'- CACACCTAACTTACGGG-3'		
<i>N. helminthoeca</i>			
	5'-TAGGCCCGCGTTAGATTAGCTTGT-3'	200	HEADLEY et al., 2006
	5'-TACAACCCAAGGGCCTTCATCACT-3'		

**Tabela 4.** Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR e nested PCR para agentes da Família Anaplasmataceae baseadas no gene *16S rRNA*.

<b>Reação Agente</b>	<b>Seqüências Térmicas</b>
<b>PCR</b> <i>E. canis</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>E. canis</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>E. chaffeensis</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>E. chaffeensis</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>A. phagocytophilum</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>A. phagocytophilum</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>A. platys</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 90 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>E. ewingii</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>E. ewingii</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>N. risticii</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>N. risticii</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>N. helminthoeca</i>	- 94°C por 2 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 67°C e 45 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos

#### 4.6.2.2. Reação de Amplificação do tipo nested PCR para *Ehrlichia* sp. baseada no gene *omp-1*

A família multigênica *omp-1* codifica proteínas externas de membrana que são específicas ao gênero *Ehrlichia*. Esta PCR foi utilizada para aquelas amostras positivas na nested PCR para *Ehrlichia* sp., baseada no gene *16S rRNA*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram conP28-F1 (5'-AT(C/T)AGT(G/C)AAA(A/G)TA(T/C)(A/G)T(G/A)CCAA-3') e conP28-R1 (5'-TTA(G/A)AA(A/G)G(C/T)AAA(C/T)CT(T/G)CCTCC-3') na primeira reação e conP28-F2 (5'-CAATGG(A/G)(T/A)GG(T/C)CC(A/C)AGA(AG)TAG-3') e conP28-R2 (5'-TTCC(T/C)TG(A/G)TA(A/G)G(A/C)AA(T/G)TTTAGG-3') na segunda reação (300 pb). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura com 10µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 50µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A segunda reação da nested PCR foi conduzida utilizando-se 1µL do produto amplificado na primeira PCR (INAYOSHI et al., 2004).

#### 4.6.2.3. Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. baseada no gene dissulfito oxidoreductase (*dsb*)

Da mesma forma que no exposto acima, as amostras positivas na PCR para *Ehrlichia* spp. baseada no gene *16S rRNA* foram também submetidas a PCR baseada no gene *dsb*. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *dsb-330* (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') e *dsb-728* (5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'), que amplificam um fragmento de 409 pb de *Ehrlichia* sp. (DOYLE et al., 2005). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50 µL, contendo uma mistura contendo 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase

(Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 50 µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.4. Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. baseada no gene *ftsZ***

As amostras positivas para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. para o gene *16S rRNA* foram submetidas a uma PCR que amplifica um fragmento do gene *ftsZ* (aproximadamente 900 pb), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *ftsZF2* (5'-GGTAGAATTAGAGTATCTGT-3') e *ftsZR2* (5'-TTCTTTCTAAAAAAMGYWGG-3') (LEE et al., 2003). *Ftsz* é uma das mais conservadas proteínas relacionadas à divisão celular das eubactérias e arqueobactérias (LEE et al., 2003). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.5. Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. baseada no gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*)**

As amostras positivas para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. para o gene *16S rRNA* foram submetidas a uma PCR que amplifica um fragmento do gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) (aproximadamente 1600 pb), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores D4α (5'-TIATGGGIICIAAIATGCA-3') e R7u (5'-GCCCAICATTCCATITCICC-3') (TAILLARDT-BISCH et al., 2003). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do

DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.6. Reação de Amplificação para *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma sp.* baseada no gene citrato sintase (*gltA*)**

As amostras positivas nas PCRs para *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma phagocytophilum* baseadas no gene 16S rRNA foram também submetidas a PCR baseada no gene citrato sintase. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores EHR-CS136F(5'-TT(C/T)ATGTC(C/T)ACTGCT GC(G/T)TG-3') e EHR-CS778R (5'- GC(A/T/C/G)CC(A/C)CCATG(A/C)GCTGG-3') (aproximadamente 1450 pb) (INOKUMA et al., 2001a). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 50µL. A seqüencia térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.7. Reação de Amplificação para *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma sp.* baseada no gene *groESL* ("heat shock operon")**

As amostras positivas nas PCRs para *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma phagocytophilum* baseadas no gene 16S rRNA foram também submetidas a nested PCR baseada no gene *groESL* ("heat shock operon"). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores HS1a(5'-AITGGGCTGGTAITGAAAT-3') e EHR-CS778R (5'- CCICCIIGGIACIAIACCTTC-3') (SUMNER et al., 1997; NICHOLSON et al., 1999) na primeira reação; os oligonucleotídeos iniciadores HS43 (5'-

AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC-3') e HSVR (5'-CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC-3') foram utilizados na segunda reação (nested PCR) (LOTRIC-FURLAN et al., 1998). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na nested PCR amplificam um fragmento de 1297 pb da região do "heat shock operon", a qual inclui a porção final do gene *groES*, a região intergênica compreendida entre os genes *groES* e *groEL*, e aproximadamente dois terços do gene *groEL*. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25  $\mu$ L, contendo uma mistura contendo 5 $\mu$ L do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 2,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25 $\mu$ L. A seqüência térmica e de tempo de amplificação envolveram 3 ciclos preliminares compreendendo desnaturação de 1 minuto a 94°C, 2 minutos de anelamento a 48°C e extensão a 72°C por 90 segundos; em seguida procedeu-se a 37 ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 90 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Na segunda reação (nested PCR), a temperatura de anelamento foi aumentada para 55°C (LIZ et al., 2000).

#### **4.6.2.8. Reação de Amplificação para *Anaplasma phagocytophilum* baseada no gene *msp-2***

Levando em consideração o fato de que a nested PCR utilizada no atual estudo (MASSUNG et al., 1999) amplifica tanto DNA de *A. phagocytophilum* quanto de *A. platys*, foi realizada uma PCR específica para o primeiro agente, baseada no gene *msp-2* (CASPERSEN et al., 2002). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram MSP465-F (5'-TGATGTTGTTACTGGACAGA-3') e MSP980-R (5'-CACCTAACCTTCATAAGAA-3), que flanqueiam um segmento de 550 pb. Na reação foram utilizados 1,25U Taq DNA Polimerase, Tampão da PCR, 0,2mM de deoxinucleotídeos, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,5 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25 $\mu$ L. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 94°C por 2 minutos 2 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C; 2 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos

a 60°C e 30 segundos a 72°C; 2 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C; 2 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 30 segundos a 72°C e 2 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C, seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.9. Reação de Amplificação para *Anaplasma phagocytophilum* baseada no gene *ankA***

As amostras positivas para *A. phagocytophilum* para o gene *16S rRNA* foram submetidas a uma PCR que amplifica um fragmento do gene *ankA* (444pb), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *anka-F* (5'-GAGAGATGCTTATGGTAAGAC-3') e *anka-R* (5'-GGTTCAGCCATCATTGTGAC-3') (450 pb) (CATUREGLI et al., 2000). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.6.2.10. Padronização de uma PCR multiplex para amplificação de DNA de *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp.**

##### **4.6.2.10.1. Seleção de genes-alvo**

Sequências baseadas nos genes *16S rRNA*, *ftsZ*, *rpoB*, *gltA*, *groE*, *dsb* e *nuoG* (gene da subunidade gama da desidrogenase NADH) para os gêneros *Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e agente IOE – *Ixodes ovatus Ehrlichia*), *Anaplasma* (*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. bovis*) e *Bartonella* (*B. quintana*, *B. henselae*, *B. grahamii*, *B. tribocorum*, *B. bacilliformis*, *B. schoenbuchensis*, *B. clarridgeiae*, *B. rochalimae*, *B. washoensis*, *B. koehlræ*, *B. vinsonii subsp. arupensis*, *B. vinsonii subsp. vinsonii*, *B.*

*vinsonii* subsp. *berkhofii*, *B. taylori*, *B. alsatica*, *B. elizabethae* e *B. bovis*) foram adquiridas a partir da página do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Tais sequências foram alinhadas para a obtenção de sequências consenso para os três gêneros em questão, utilizando-se os programas BioEdit e ClustalX.

#### **4.6.2.10.2. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise**

As sequências-consenso obtidas para os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Bartonella* para os diversos genes foram utilizadas para a busca de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probes TaqMan) utilizando-se o programa AlleleID6 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, EUA). O software em questão foi utilizado para a busca de oligonucleotídeos iniciadores com 16 a 18 nucleotídeos e temperatura de melting de  $50,0 \pm 2^\circ\text{C}$ , sondas de hidrólise TaqMan com 16 a 18 nucleotídeos e temperatura de melting de  $7,0 \pm 2^\circ\text{C}$  e amplicons com 75 a 120 pb.

#### **4.6.2.10.3. Teste de especificidade de oligonucleotídeos iniciadores**

Uma vez desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies<sup>®</sup>, Coralville, Iowa, Estados Unidos) pelo software AlleleID6, a especificidade dos mesmos para os gêneros em questão foi testada por meio de uma PCR em tempo real utilizando o SyBrGreen como fluoróforo. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 10 $\mu\text{L}$ , contendo uma mistura contendo 1 $\mu\text{L}$  do DNA-amostra, 0,2 $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão da PCR (IQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10 $\mu\text{L}$ . A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95 $^\circ\text{C}$  por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95 $^\circ\text{C}$  por 10 minutos e 55 $^\circ\text{C}$  por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX384 Thermal Cycler (BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). Os oligonucleotídeos iniciadores foram testados contra representantes dos gêneros *Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris* e agente IOE – *Ixodes ovatus Ehrlichia*), *Anaplasma* (*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. bovis*),

*Bartonella* (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii berkhofii*, *B. phoceensis*, *B. schoenbuchii*, *B. chomelli*, *B. bovis*, *B. alsatica* e *B. birtlesii* e *Bartonella* Th239), *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. slovaca*, *R. typhi*, *R. prowazekii*), *Neorickettsia* (*N. risticii*, *N. helminthoeca*, *N. sennetsu*) e *Orientia tsutsugamushi*.

#### 4.6.2.10.4. Teste de especificidade das sondas de hidrólise

Após a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores ser testada por meio de uma PCR em tempo real com sistema SyBrGreen, aqueles que se mostraram específicos para os gêneros sob estudo foram submetidos a uma PCR em tempo real utilizando desta vez sondas de hidrólise (probes TaqMan). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 10 $\mu$ L, contendo uma mistura contendo 1 $\mu$ L do DNA-amostra, 0,2 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água estéril ultra-pura (Nuclease-Free Water, Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10 $\mu$ L. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX384 Thermal Cycler (BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

#### 4.6.2.10.5. Aquisição de seqüências não disponíveis no GenBank

Produtos resultantes da amplificação do gene *groE* para *A. bovis* e do gene *nuoG* para *B. chomelli*, *B. alsatica*, *B. schoenbuchii* e *Bartonella* Th239 foram clonados no vetor pGEM T-Easy (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e seqüenciados a fim de obter seqüências que não estavam disponíveis no GenBank, objetivando o desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise.

#### 4.6.2.10.6. Teste de sensibilidade dos ensaios de PCR “singleplex” e multiplex

A sensibilidade dos ensaios “singleplex” e multiplex foi testada com plasmídeos (IDT psmart, (Integrated DNA Technologies<sup>®</sup>, Coralville, Iowa, Estados Unidos) contendo as seqüências-alvo para amplificação do DNA dos gêneros *Ehrlichia*,

*Anaplasma* e *Bartonella* (**Tabela 5**). Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ( $2,0 \times 10^7$  cópias/  $\mu\text{L}$  a  $2,0 \times 10^0$  cópias/  $\mu\text{L}$ ). O número de cópias de plasmídeos será determinado de acordo com a fórmula ( $Xg/ \mu\text{L DNA/ [tamanho do plasmídeo (pb) \times 660] \times 6.022 \times 10^{23}$  x cópias do plasmídeo/ $\mu\text{L}$ ).

**Tabela 5.** Plasmídeos utilizados para avaliar a sensibilidade da PCR multiplex para os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Bartonella*.

Agente	Gene-alvo	Plasmídeo
<i>Ehrlichia</i> sp.	groE	TTATCGTTACATTGAGAAGCACTCTGAGTAATTATATT AGCAATAGCAAGAGCCAATGGATCTTCTGGCTTTATA CTTTAATAACTTTATATC
<i>Anaplasma</i> sp.	groE	GCGAGCATAATTACTCAGAGTGCGTCTCAGTGTAAT GATAAGGTGGGTGACGGAECTACTACATGCTCCATA CTG
<i>Bartonella</i> sp.	nuoG	CAATCTTCTTTTGCTTCACCCGGAGCAAAACCAGCCC GATTTGTCATTTGAACACGTCCTTCTGTATTACATAA AGCCCTGA

#### 4.6.2.11. PCR em tempo real para *Ehrlichia chaffeensis* baseada no gene *vlpt*

As amostras positivas na PCR para agentes Anaplasmataceae pelo gene *16S rRNA* foram submetidas à uma PCR em tempo real baseada no gene *vlpt* para *E. chaffeensis*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-CTAATTCTGATTTACACGAGTCTTC-3') e R (5'-GCATCATCTTCGAATTGAACTTC-3') e a sonda de hidrólise TaqMan 5'[TAMRA] (TTGAGTGTCC[BHQ2a-Q]3' (RELLER et al., 2010). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 10 $\mu\text{L}$ , contendo uma mistura contendo 1 $\mu\text{L}$  do DNA-amostra, 0,2 $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10 $\mu\text{L}$ . A

seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX384 Thermal Cycler (BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

#### **4.6.2.12. PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* baseada no gene *msp-2***

As amostras positivas na PCR para agentes Anaplasmataceae pelo gene 16S *rRNA* foram submetidas à uma PCR em tempo real baseada no gene *msp-2* para *A. phagocytophilum*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies<sup>®</sup>, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-GAAGATGAWGCTGATACAGTA-3') e R (5'-CAACHGCCTTAGCAAAC-3') e a sonda de hidrólise TaqMan 5'[Cy-5] TTATCAGTCTGTCCAGTAACA[BHQ2a-Q]3' (RELLER et al., 2010). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 10µL, contendo uma mistura contendo 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água estéril ultra-pura (Nuclease-Free Water, Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX384 Thermal Cycler (BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

#### **4.6.2.13. PCR multiplex em tempo real para riquetsias do “Grupo da Febre Maculosa” e do “Grupo do Tifo” e *Orientia tsutsugamushi***

As amostras foram submetidas a uma multiplex PCR objetivando-se a amplificação do DNA de *Rickettsia* spp. (grupos da febre maculosa e do tifo) e *Orientia tsutsugamushi*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probes TaqMan) descritos na **Tabela 6** (PRAKASH et al., 2009). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 10µL, contendo uma mistura contendo 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão da

PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX384 Thermal Cycler (BioRad<sup>®</sup>, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probes TaqMan) utilizados na PCR multiplex em tempo real para amplificação de *Rickettsia* spp. (Grupos da Febre Maculosa e Tifo) e *Orientia tsutsugamushi*.

Agentes (Gene-alvo)	Oligonucleotídeos iniciadores	Sonda de hidrólise (Probes TaqMan)
<i>Rickettsia</i> sp. (“Grupo da Febre Maculosa”) (gene ompA)	F (5'-TGTCAGGCTCTGAAGCTAAA-3') R (5'-AGCACCTGCCGTTGTGATATC-3')	5'[FAM] TAGCCGCAGTCCCTACAACAC[BHQ2a-Q]3'
<i>Rickettsia</i> sp. (“Grupo do Tifo”) (gene da lipoproteína de 17kDa)	F (5'-ACTTGTTCTCAATTCGGTCAC-3') R (5'-GACACTTGACCGATTGTCC-3')	5'[TXRED] TGCCCCAAGTAATGCGCC[BHQ2a-Q]3'
<i>Orientia tsutsugamushi</i> (gene da proteína externa de superfície de 56kDa)	F (5'-GGTGGTAATGCTTTCGCTAAT-3') R (5'-TGCTGCTTCTTGCCTGTAG-3')	5'[Cy-5] TGCTGCTGTTGCTGCCCTTGCC [BHQ2a-Q]3'

#### 4.6.3. Reações de Amplificação para hemoplasmas

##### 4.6.3.1. Reação de Amplificação para *Mycoplasma haemofelis*/*M. haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*/*M. haematoparvum* baseada no gene 16S rRNA

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene 16S rRNA: “Forward” (5'- ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3') e “Reverse” (5'-ACGCCCAATAAATCC GRATAAT -3'); fragmentos de 170 e 190 pb são obtidos para *M. haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum*, respectivamente. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Kewish et al. (2004). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 2,5µL do DNA-amostra, 1,0mM de cada deoxinucleotídeo,

0,625µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 45 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. Os DNAs controles positivos de *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum* foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Joanne Messick (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos).

#### **4.6.3.2. Reação de Amplificação para *Mycoplasma haemofelis* e *M. haemocanis* baseada no gene 16S rRNA**

As amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma* (protocolo descrito acima) foram submetidas a uma PCR para *Mycoplasma haemofelis/M. haemocanis*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene 16SrRNA: Hfelis-fl (5'-GACT TTGGTTTCGGCCAAGG-3') e Hfelis-r3 (5'-CGAAGTACTATCATAATTATCCC TC-3') (400 pb). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Berent et al. (1998). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os DNAs controles positivos de *Mycoplasma haemofelis* e *M. haemocanis* foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Joanne Messick (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos).

#### 4.6.3.3. Reação de Amplificação para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* baseada no gene *16S rRNA*

As amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma* foram submetidas a uma PCR para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*/M. *haematoparvum*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene *16SrRNA*: CALI-F1 (5'-GCATAATGTGTCGCAATC-3') e CALI-R1 (5'-GTTTCAACTAGTACTTTCTC CC-3')<sup>5</sup> (200 pb). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 38 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos.

#### 4.6.3.4. Reação de Amplificação para *Mycoplasma turicensis* baseada no gene *16S rRNA*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene *16S rRNA*: MT-Fw (5'-GTATCCTCCATCAGACAGAA-3') e Mt2 -Rv(5'-CGCTCCATATTTAATTCCAA-3') (400 pb). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Santos et al. (2009). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos. O DNA controle positivo de *Mycoplasma turicensis* foi

---

<sup>5</sup> Referência pessoal: Andréa Santos (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos)

gentilmente cedido pela Profa. Dra. Joanne Messick (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos).

#### **4.6.3.5. Reação de Amplificação para *Mycoplasma* sp. baseada no gene 16S rRNA (fragmento de 600 pb)**

As amostras positivas nas PCRs acima descritas para micoplasmas hemotróficos foram submetidas a uma PCR para o gene 16S rRNA, cujos oligonucleotídeos iniciadores (HBT-F – 5'- ATACGGCCCATATTCCTACG-3'; HBT-R – 5'- TGCTC CACCACTTGTTCA-3') amplificam um fragmento de 600pb (Criado-Fornelio et al., 2003c). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### **4.6.3.6. Reação de Amplificação para *Mycoplasma* sp. baseada no gene 16S rRNA (fragmento de 1475 pb)**

As amostras positivas nas PCRs acima descritas para micoplasmas hemotróficos foram submetidas a uma PCR para o gene 16S rRNA, cujos oligonucleotídeos iniciadores (8F–5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R–5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3') amplificam um fragmento de 1475 pb (Pitulle et al., 1999). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a

48°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos (Sykes et al., 2005).

#### **4.6.3.7. Reação de Amplificação para *Mycoplasma* sp. baseada no gene *rnpB***

As amostras positivas nas PCRs baseadas no gene *16S rRNA* para micoplasmas hemotróficos foram submetidas a uma PCR para o gene RNA da RNAase P, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 80F1 (5'-GAGGAAAGTCCRYGCTW GCAC-3') e 290R1 (5'-TCCCYTACCRAAATTTTRGGTTTCT-3) (BIRKENHEUER et al., 2002) (aproximadamente 200 pb). O gene *rnpB* é universalmente presente nas bactérias e codifica a subunidade RNA da endoribonuclease P; trata-se de um gene adequado para estudos filogenéticos de taxa muito próximos devido a sua alta taxa de variação nucleotídica (PETERS et al., 2008). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### **4.6.4. Reações de Amplificação para piroplasmas**

##### **4.6.4.1. Reação de Amplificação para *Babesia* sp (gene *18S rRNA*).**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene *18S rRNA* presente na maioria das espécies de babesias: Piro A (5'- AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'- TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3') (400 pb). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por CARRET et al. (1999), com algumas modificações. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50µL, contendo uma mistura contendo 10µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,625U de

Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 50µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos. O controle positivo de *B. canis vogeli* foi obtido a partir de um cão com babesiose atendido na rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP Jaboticabal.

#### **4.6.4.2. Reação de Amplificação do tipo nested PCR para *Babesia* sp. (gene 18S rRNA)**

A fim de aumentar a sensibilidade da técnica de detecção molecular de *Babesia* sp., os oligonucleotídeos iniciadores BTF1 (5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'), BTR1 (5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'), BTF2-(5'-CCGTGCTAATTGTAGGGC TAATAC-3') e BTR2-(5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3') foram utilizados em uma nested PCR para amplificação de um fragmento (800pb) do gene 18S rRNA. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Jefferies et al. (2007). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,75U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por 45 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos. Na segunda amplificação (nested PCR), a temperatura de anelamento utilizada foi de 62°C.

#### **4.6.4.3. Reação de Amplificação do gene 18S rRNA de *Babesia* sp.**

A fim de obter um fragmento maior do gene 18S rRNA, as amostras positivas na nested PCR (protocolo de Jefferies et al., 2007) foram submetidas outra PCR para formar uma seqüência consenso de tamanho considerável para a análise filogenética.

Fragmentos do gene 18 rRNA foram obtidos por meio da amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5.1 (5'-CCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT-3') (YABSLEY et al., 2005) e B (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (MEDLIN et al., 1988) na primeira reação e os oligonucleotídeos 5.1 e 3.1 (5'- CTCCTTCCTTTAAGTGATAAG-3') (YABSLEY et al., 2005) na segunda reação. A seqüência térmica e de tempo de amplificação tanto da primeira quanto da segunda reação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos, 0,8µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 2,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL.

#### **4.6.4.4. Reação de Amplificação do gene da $\beta$ -tubulina de *Babesia* sp.**

As amostras positivas na nested PCR (protocolo de Jefferies et al., 2007) foram submetidas à amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -tubulina (1198 pb) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Tubu-3 (5'- CAAATWGGYGCMARTTYTGGGA-3') e Tubu-63F (5'- TCGTCCATACCTTCWCCSGTRTACCAGTG-3') (ZAMOTO et al., 2004). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos, 0,8µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 2,5U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### **4.6.4.6. Reação de Amplificação para *Cytauxzoon* sp. baseada no gene 18S rRNA**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene da subunidade menor do 18S rRNA: 5'-

GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3' e 5'-CCAAATGATACTCCGGAAAGAG-3', amplificando um fragmento de 300 pb. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Birkenheuer et al. (2006), utilizando as mesmas soluções e concentrações da PCR para *Babesia sp.*, com exceção da Taq Polimerase, da qual foi utilizada 1,25U e dos oligonucleotídeos iniciadores, dos quais foram utilizados 25pmol. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### **4.6.4.6. Reação de Amplificação para *Cytauxzoon sp.* baseada nas regiões intergênicas 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2)**

Para aquelas amostras positivas na PCR baseada no gene *18S rRNA* (região gênica altamente conservada que codifica uma molécula de RNA funcional), foram realizadas também reações de amplificações baseadas nas regiões não codificadoras ITS-1 e ITS-2. Estas regiões mostram maior variabilidade, uma vez que evoluem mais rapidamente ao longo do tempo, não sendo responsáveis pela codificação de componentes estruturais do RNA. Assim, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1-F (5'-CGATCGAGTGATCCGGTGAATTA-3') e ITS1-R (5'-GCTGCGTCCTTCATCG ATGTG-3'), os quais produzem um amplicom de tamanho esperado de 651pb, que incorpora uma região ITS1 de 458 pb e regiões flanqueadoras parciais 18S e 5,8S. Os oligonucleotídeos iniciadores para ITS-2 foram ITS2-F (5'-TGAACGTATTAGACACACCACCT-3') e ITS2-R (5'-TCCTCCCGCTTCACTCG CCG-3'), os quais produzem um amplicon de tamanho esperado de 431pb que incorpora uma região ITS2 de 265 pb e regiões flanqueadoras parciais 28S e 5,8S. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Brown et al. (2009a), utilizando 4µL do DNA-amostra, 0,4mM de cada deoxinucleotídeo, 37,5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura estéril q.s.p. 50µL. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 10 minutos.

#### **4.6.7. Reações de Amplificação para *Hepatozoon* sp.**

##### **4.6.7.1. Reação de Amplificação para *Hepatozoon* sp. (fragmento de 650pb do gene *18S rRNA*)**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene 18SrRNA: HEP-F (5'- ATACATGAGCAAAATCTCAAC -3') e HEP-R (5'- CTTATTCCATGCTGCAG -3') (650 pb). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Inokuma et al. (2002), com algumas modificações. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 63,2°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos. O controle positivo de *Hepatozoon canis* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Lucia H. O'Dwyer (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu).

##### **4.6.7.2. Reação de Amplificação para *Hepatozoon* sp. (fragmento de 1750pb do gene *18S rRNA*)**

As amostras positivas na PCR acima descrita foram submetidas à uma PCR que amplifica um fragmento de 1750 pb do gene *18S rRNA*, a fim de facilitar futuros alinhamentos e análises filogenéticas. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram HAM-1 (5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTC-3') e HPF-2 (5'-GACTTCTCCTTCGTCTAAG-3') (Criado-Fornelio et al., 2006). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq Platinum DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência

térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### **4.6.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base. Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®).

### **4.7. Reações de Clonagem e Seqüenciamento**

#### **4.7.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose**

Após a reação de PCR, as bandas referentes a cada amplímero foram cortadas do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 2,0 mL devidamente identificados. Na seqüência, foi realizada extração do produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se o Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Life Sciences®, São Paulo, São Paulo) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.7.2. Quantificação de DNA dos amplímeros**

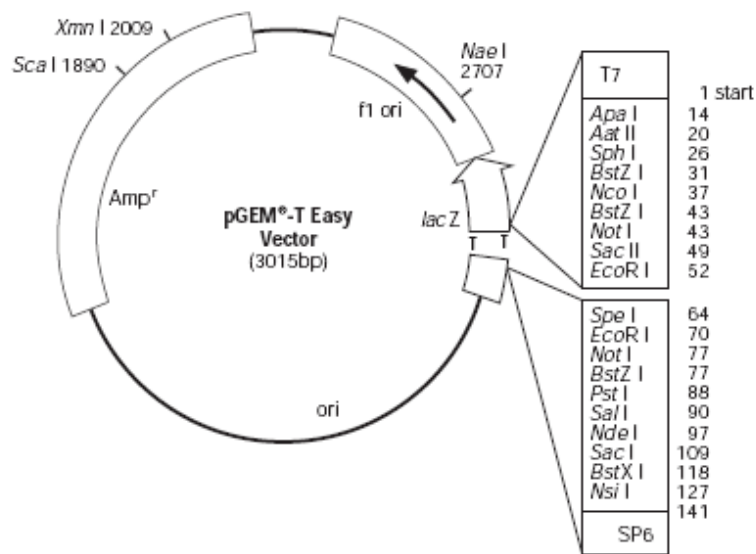
A quantificação de material purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, Dubuque, Illinois, Estados Unidos), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

#### 4.7.3. Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy

A clonagem dos produtos amplificados foi feita com o vetor pGEM-T Easy (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e as reações executadas conforme indicação do kit. As concentrações de DNA e vetor a serem utilizadas na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter ao final uma relação inserto:vetor de 8:1 com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Relação inserto : vetor} = \text{ng do inserto}$$

A reação de ligação do DNA de interesse com o vetor, de volume final 10 µL consistiu de 40 ng de inserto (DNA amostra), 5 µL de tampão da enzima, 50 ng do vetor pGEM-T Easy, 1 µL da enzima T4 Ligase e água deionizada q.s.p. As soluções serão misturadas e incubadas a 4°C “overnight” para obtenção do número máximo de transformantes. **A Figura 1** mostra o desenho do vetor pGEM-T Easy.



**Figura 1.** Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

#### 4.7.4. Transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH10B

O produto da ligação descrita anteriormente foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* JM109 ( $>10^8$  cfu/ $\mu$ g) (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Foram adicionados 4  $\mu$ L da reação de ligação a 50  $\mu$ L de células competentes e a mistura foi mantida por 20 minutos em gelo. O choque térmico das células foi realizado colocando os microtubos num banho de água a 42°C por 50 segundos, e, em seguida, transferindo-os novamente para o gelo por 2 minutos. Foram adicionados 950  $\mu$ L de meio líquido SOC e as células incubadas a 37°C durante 60 minutos em agitação. Às placas contendo meio sólido 2YT (16 g de Triptona; 10 g de Extrato de Levedura; 5,0 g de NaCl; 12 g de Agar; água destilada q.s.p. 1000 mL) e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e preparadas com 40  $\mu$ l de X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) (0,026%) e IPTG (isopropylthio- $\beta$ -galactoside) (0,82mM) foram adicionados 100  $\mu$ l de células transformadas. As colônias de bactérias contendo estes clones (colônias brancas) foram transferidas para tubos cônicos para centrífuga de 15 mL contendo 3 mL de meio líquido 2xTY e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C por até 24 horas foi realizada a análise dos clones transformantes.

#### 4.7.5. Mini-preparação de DNA Plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o QIAprep Miniprep Kit, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen<sup>®</sup>, Valencia, Califórnia, Estados Unidos). A concentração de DNA foi mensurada utilizando-se aparelho espectrofotômetro (Nanodrop<sup>®</sup>, Thermo Scientific).

#### 4.7.6. Seqüenciamento

O seqüenciamento dos produtos amplificados e purificados foi realizado através do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Para o seqüenciamento dos produtos diretos da PCR utilizaram-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR. Para o seqüenciamento de produtos amplificados clonados, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores T7 (TAATACGACTCACTATAGG) e SP6

(GATTTAGGTGACACTATAG), na concentração de 1 $\mu$ M os quais flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM T-easy. O protocolo da reação de seqüenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5  $\mu$ L do Tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl<sub>2</sub>); 0,5  $\mu$ L de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5  $\mu$ L de água ultra-pura e 1,5  $\mu$ L de DNA (sendo este ajustado de acordo com sua concentração, mensurada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific). As amplificações foram realizadas inicialmente no termociclador (MJ Research-Inc).

O processo de lavagem das amostras foi feito adicionando-se 80  $\mu$ L Isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200  $\mu$ L de Etanol 70% foram adicionados e a placa novamente centrifugada, agora por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de Etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração 1) e em seguida colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O seqüenciamento foi conduzido no seqüenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp Jaboticabal) ou na CoreStore DNA Facility, localizado nas dependências da Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

#### **4.7.7. Análise das Seqüências**

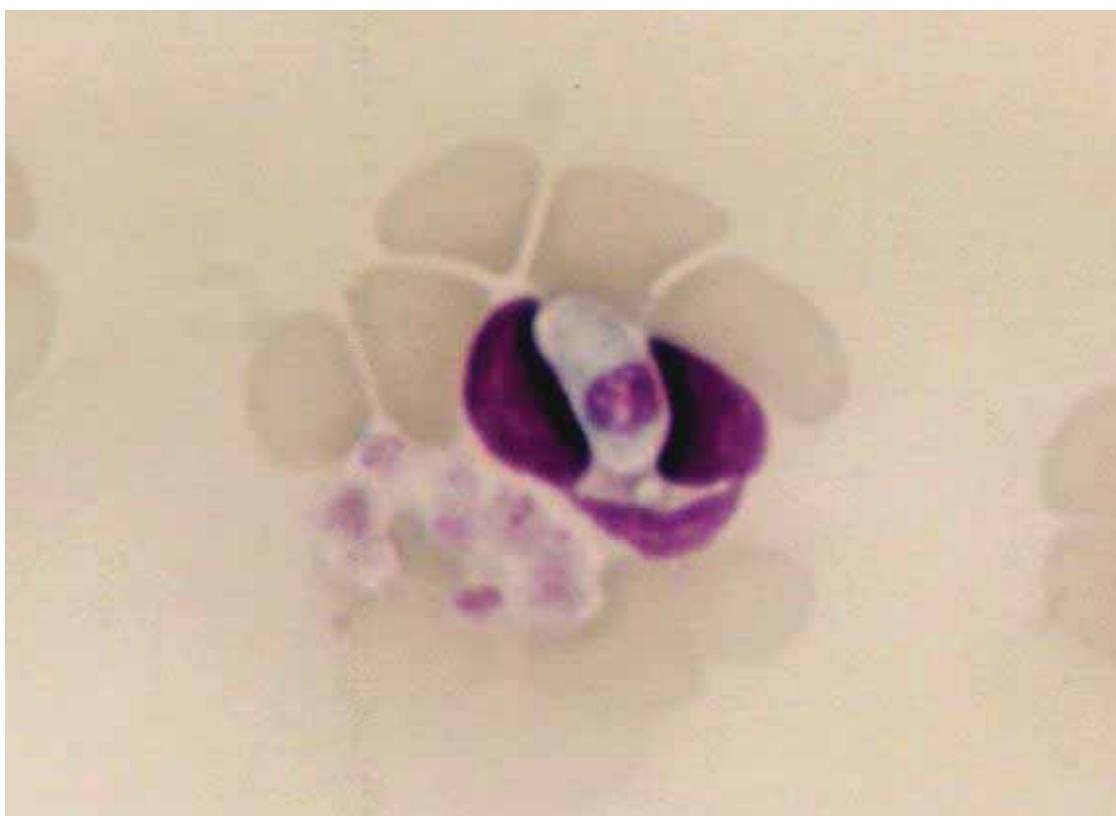
As seqüências de nucleotídeos obtidas no seqüenciamento foram submetidas a alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular (FCAV- UNESP Jaboticabal) e na CoreStore DNA Facility (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, EUA) . A trimagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos seqüenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes à cada base seqüenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram

consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) foi utilizado para realizar o alinhamento da seqüência consenso. O programa BLAST foi utilizado para analisar as seqüências de nucleotídeos (BLASTn), objetivando-se procurar e comparar seqüências similares em banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002) com aquelas obtidas. As seqüências salvas em modo "FASTA" foram analisadas então com o programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1994), no qual foram obtidos alinhamentos múltiplos. As seqüências foram então salvas em modo ".ALN" e utilizadas no programa MEGA-4 ("Phylogenetic and molecular evolutionary analyses – MEGA version 4.0 (KUMAR et al., 2004), onde foram desenhadas árvores filogenéticas. As seqüências alinhadas foram reamostradas com "bootstrap" (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 replicações, com o método "neighbor-joining" e Kimura-2 parâmetros.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Esfregaços sanguíneos

Dentre os 268 carnívoros selvagens amostrados, não foram encontradas inclusões sugestivas de agentes Anaplasmataceae em leucócitos e, tampouco, estruturas sugestivas de hemoplasmas e piroplasmas em hemácias nos esfregaços sanguíneos corados e confeccionados a partir de punção de capilar marginal de ponta de orelha. Gamétocitos de *Hepatozoon* sp. foram encontrados em um esfregaço sanguíneo de um gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí (**Figura 2**).



**Figura 2.** Fotomicrografia evidenciando gametócito de *Hepatozoon* sp. em neutrófilo presente em esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa de um gato-do-mato-pequeno da AMC, Jundiaí, SP (Aumento de 1000x).

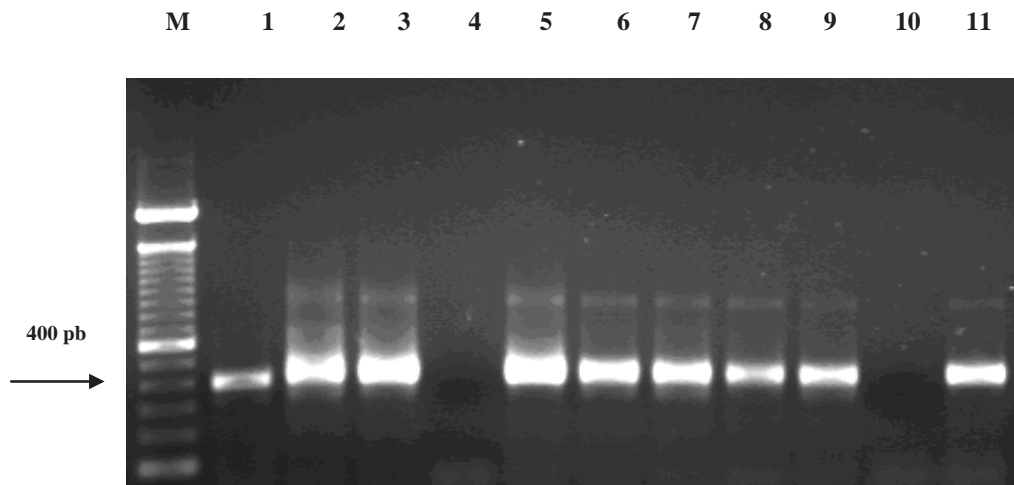
## 5.2. Ectoparasitas

Não foram encontrados carrapatos parasitando os animais sob estudo. Por outro lado, pulgas do gênero *Ctenocephalides* sp. foram encontradas parasitando os animais amostrados na AMC de Jundiá e Zoológico de Ribeirão Preto.

## 5.3. Sorologia e PCR para *E. canis*

Doze felídeos (7,2%) mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *E. canis*: um gato-palheiro da AMC, um gato-mourisco da AMC, cinco gatos-do-mato-pequeno (um animal na AMC, um no Zoológico de Sorocaba, um no Zoológico de Catanduva e dois do Zoológico de Ilha Solteira), um gato-maracajá da AMC e três jaguatiricas (duas da AMC e uma do Zoológico de Piracicaba). Os títulos de anticorpos variaram de 64 a 2048: dez animais mostraram títulos de anticorpos 64, um animal mostrou título de 1024 e um animal mostrou título de 2048 (**Tabela 7**).

Dos 167 felídeos selvagens amostrados, 21(12,57%) mostraram-se positivos na nested PCR para *E. canis*. Na AMC, sete animais foram positivos: cinco jaguatiricas, um gato-mourisco e um gato-do-mato-pequeno. Nos demais Zoológicos, uma jaguatirica do Zoológico de Itatiba, duas jaguatiricas do Zoológico de Piracicaba, um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Brasília, dois gatos-do-mato-pequeno do Zoológico de Nova Odessa, um leão do Zoológico de Americana, um leão do Zoológico de Bauru, uma suçuarana do Zoológico de Catanduva, uma suçuarana do Zoológico de Americana, um gato-mourisco do Zoológico de Itatiba, uma onça-pintada do Zoológico de Pedreira, uma onça-pintada do Zoológico de Campinas e uma suçuarana do Zoológico de Ribeirão Preto foram positivos na nested PCR de *E. canis* (**Figura 3**). Nenhum animal mostrou-se positivo na nPCR para *E. canis* e ao mesmo tempo soropositivo para *E. canis*, *E. chaffeensis* ou *N. risticii*. Apenas um gato-do-mato-pequeno apresentou-se positivo na nPCR para *E. canis* e concomitantemente soropositivo para *A. phagocytophilum* (título de 128) (**Tabela 7**).

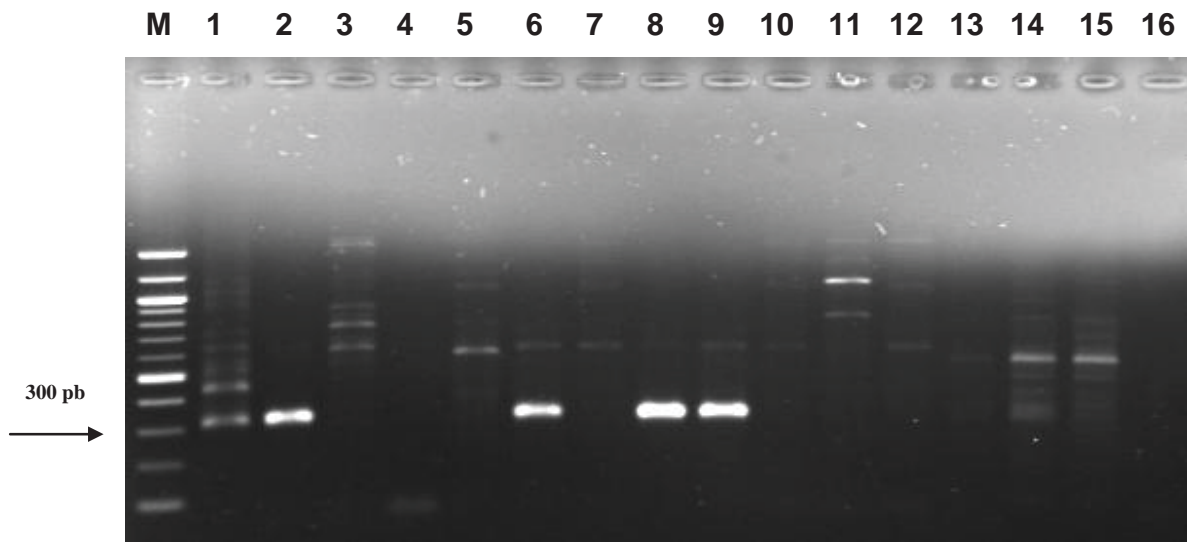


**Figura 3.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN5/HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen<sup>®</sup>); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 2 até 3: amostradas de jaguatirica positivas; Canaleta 4: gato-maracajá negativo; Canaleta 5 até 6: amostras positivas de jaguatirica; Canaleta 7 até 8: amostras positivas de gato-do-mato-pequeno; Canaleta 9: amostra positiva de puma; Canaleta 10: branco; Canaleta 11: amostra positiva de onça-pintada.

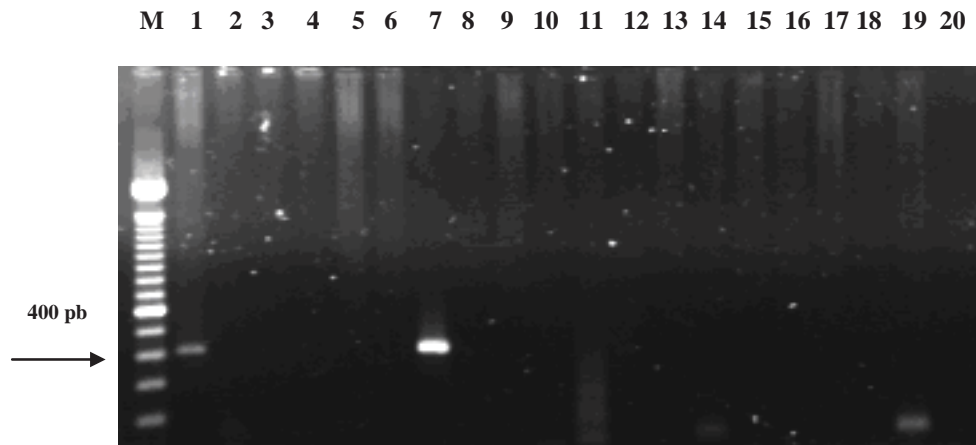
Em relação aos canídeos selvagens, somente três (3%) animais apresentaram anticorpos anti-*E. canis*: um cachorro-do-mato do Zoológico de Piracicaba (título de 1024), um cachorro-do-mato do Zoológico de Araçatuba (título de 1024) e um lobo-guará do Zoológico de São Paulo (título de 64). Estes três animais soropositivos para *E. canis* mostraram-se soronegativos para *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* e *N. risticii*. Oito (8%) canídeos selvagens foram positivos na nested PCR para *E. canis*: dois cachorros-vinagre do Zoológico de Cuiabá, um cachorro-do-mato do Zoológico de Ribeirão Preto, dois cachorros-vinagre e um cachorro-do-mato do Zoológico de Piracicaba, um cachorro-do-mato do Zoológico de Araçatuba e um lobo-europeu do Zoológico de São Paulo. Apenas um cachorro-do-mato mostrou-se positivo tanto na PCR quanto na sorologia para *E. canis* (**Tabela 7**).

Dos 29 canídeos e felídeos selvagens positivos na nested PCR para *E. canis* pelo gene *16S rRNA*, quatro também foram positivos na nested PCR baseada no gene *omp-1*: uma onça-pintada do Zoológico de Pedreira e três jaguatiricas da Associação

Mata Ciliar de Jundiá (Figura 4). Um cachorro-do-mato de Piracicaba mostrou-se positivo na PCR para *Ehrlichia* sp. pelo gene *dsb* (Figura 5). Os demais animais positivos na nPCR para *E. canis* pelo gene *16S rRNA* não apresentaram produto amplificado pela PCR para os genes *dsb*, citrato sintase, *groESL*, *ftsZ* e *rpoB* (Tabela 7).



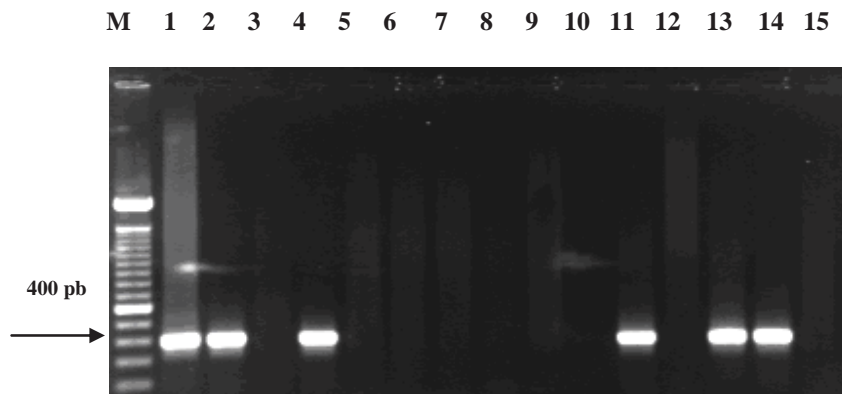
**Figura 4.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Ehrlichia* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores conP28-F2/conP28-R2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 2: amostra positiva de onça-pintada (Zoológico de Pedreira); Canaletas 3 a 5: amostras de felídeos negativos; Canaleta 6: amostra positiva de jaguatirica (Jundiá); Canaleta 7: amostra negativa de felídeo; Canaletas 8 e 9: amostras positivas de jaguatiricas (Jundiá); Canaletas 10 a 15: amostras negativas de felídeos; Canaleta 16: branco (água ultra-pura esterilizada).



**Figura 5.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Ehrlichia* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330/dsb-728. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (amostra Jaboticabal); Canaleta 7: amostra de canídeo selvagem positiva para *Ehrlichia* sp. pelo gene *dsb*; Demais canaletas: amostras anteriormente positivas na nPCR para o gene 16SrRNA e negativas na PCR para o gene *dsb*; Canaleta 20: branco (água ultra-pura esterilizada).

#### 5.4. Sorologia e PCR para *E. chaffeensis*

Nenhum canídeo e felídeo selvagem apresentou-se soropositivo para *E. chaffeensis*. Dos 167 felídeos selvagens amostrados, 12 mostraram-se positivos na nPCR para *E. chaffeensis* pelo gene *16S rRNA*. No Zoológico de Sorocaba, seis animais foram positivos (2 suçuaranas, 3 gatos-do-mato-pequeno e 1 tigre). No Zoológico de Ilha Solteira, um gato-do-mato-pequeno e uma jaguatirica mostraram-se positivos; no Zoológico de São Carlos, apenas um gato mourisco apresentou-se positivo e no Zoológico de Piracicaba uma jaguatirica. No Zoológico de Bauru, um leão e um gato-mourisco apresentaram-se positivos na nPCR para *E. chaffeensis* (**Figura 6**). Dentre os canídeos selvagens amostrados, quatro mostraram-se positivos na nPCR para *E. chaffeensis*: três cachorros-do-mato (um animal no Zoológico de Americana e dois no Zoológico de Catanduva) e um lobo-europeu no Zoológico de São Paulo. Dos 16 felídeos e canídeos selvagens positivos na nPCR para *E. chaffeensis* pelo gene *16S rRNA*, nenhum apresentou produto amplificado na PCR para os genes *omp-1*, *dsb*, *cittrato (gltA)*, *groESL*, *ftsZ* e *rpoB* (**Tabela 7**).



**Figura 6.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. chaffeensis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CHAFF/GA1UR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2: amostra de gato-do-mato-pequeno positivo (Zoológico de Ilha Solteira); Canaleta 3: amostra de felídeo negativa; Canaleta 4: amostra de cachorro-do-mato positiva (Zoológico de Americana); Canaletas 5 a 10: amostras de felídeos negativas; Canaleta 11: amostra de suçarana positiva (Zoológico de Sorocaba); Canaleta 12: amostra de felídeos negativa; Canaletas 13 e 14: amostras positivas de gatos-do-mato-pequeno (Zoológico de Sorocaba); Canaleta 15: branco (água ultra-pura esterilizada).

**Tabela 7.** Resultados da sorologia e PCR convencional para *Ehrlichia* sp. de acordo com as espécies de carnívoros selvagens amostradas.

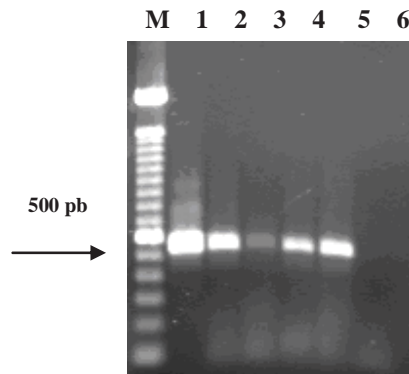
Espécie	Sorologia		PCR							
	<i>E. canis</i>	<i>E. chaffeensis</i>	16S rRNA <i>E. canis</i>	16S rRNA <i>E. chaffeensis</i>	omp-1	dsb	groESL	gltA	rpoB	ftsZ
<i>L. pardalis</i>	(2) AMC, (1) Pir	-	(5) AMC, (1) Ita, (2) Pir,	(1) IS, (1) Pir	(3) AMC	-	-	-	-	-
<i>L. tigrinus</i>	(1) AMC, (1) Sor, (1) Cat, (2) IS	-	(1) AMC, (1) Br, 2 (NO)	(3) Sor, (1) IS,	-	-	-	-	-	-
<i>L. wiedii</i>	(1) AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. colocolo</i>	(1) AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. onca</i>	-	-	(1) Ped, (1) Cps	-	(1) Ped	-	-	-	-	-
<i>P. concolor</i>	-	-	(1) Cat, (1) Am, (1) RP	(2) Sor,	-	-	-	-	-	-
<i>P. yagouaroundi</i>	(1) AMC	-	(1) AMC, (1) Ita	(1) SC, (1) Bau	-	-	-	-	-	-
<i>P. tigris</i>	-	-	-	(1) Sor,	-	-	-	-	-	-
<i>P. pardus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. caracal</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serval</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. leo</i>	-	-	(1) AM, (1) Bau,	(1) Bau	-	-	-	-	-	-
<i>P. viverrinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. venaticus</i>	-	-	(2) Cui, (1) Pir	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. thous</i>	(1) Pir, (1) Ara,	-	(1) RP, (1) Pir, (1) Ara	(1) Am, (2) Cat	-	(1) Pir	-	-	-	-
<i>C. brachyurus</i>	(1) SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vetulus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lupus</i>	-	-	(1) SP	(1) SP	-	-	-	-	-	-
<i>G. genetta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AMC – Associação Mata Ciliar, Jundiá, São Paulo; SC – São Carlos Zoo, São Paulo; NO – Nova Odessa Zoo, São Paulo; Ped – Pedreira Zoo, São Paulo; Br – Brasília Zoo, Federal District; Le – Leme Zoo, São Paulo; Cps – Campinas Zoo, São Paulo; Bau – Bauru Zoo, São Paulo; Cui – Cuiabá Zoo, Mato Grosso; Cat – Catanduva Zoo, São Paulo; Rp – Ribeirão Preto, São Paulo; Ita – Itatiba Zoo, São Paulo; Am – Americana Zoo, São Paulo; Mg – Mogi Mirim Zoo, São Paulo; Ara – Araçatuba Zoo, São Paulo; Pir – Piracicaba Zoo, São Paulo; IS – Ilha Solteira Zoo, São Paulo; SP – São Paulo, São Paulo.

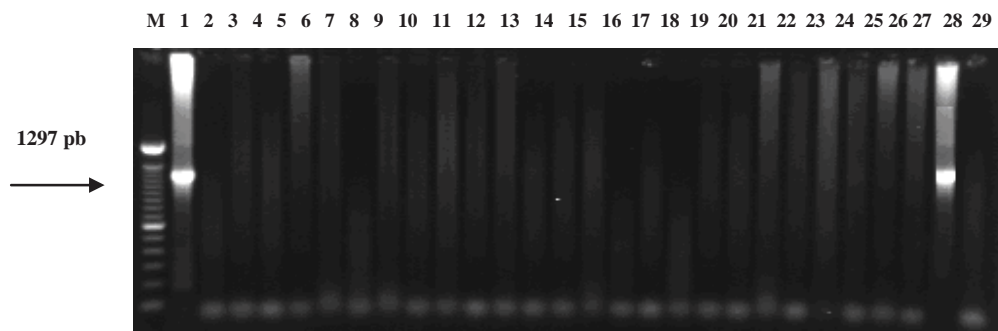
### 5.5. Sorologia e PCR para *Anaplasma* sp.

Três (1,8%) felídeos mostraram-se soropositivos para *A. phagocytophilum*: um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Ilha Solteira (título de 64), um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Nova Odessa (título de 128) e um leão do Zoológico de Ribeirão Preto (título de 64). Dos 167 felídeos selvagens amostrados, quatro gatos-do-mato-pequeno do Zoológico de Sorocaba mostraram-se positivos na nPCR para *Anaplasma* sp. baseada no gene *16S rRNA* (todos soronegativos na RIFI para *A. phagocytophilum*) (**Figura 7**). Em contrapartida, nenhum felídeo selvagem positivo na nPCR para *Anaplasma* sp. pelo gene *16S rRNA* apresentou produto amplificado nas PCRs baseadas nos genes *gltA*, *ftsZ*, *groESL*, *rpoB*, *msp-2* e *ankA*. Um canídeo selvagem mostrou-se positivo na nPCR para *Anaplasma* sp. baseada no gene *groESL*,

porém negativo nas PCRs baseadas nos demais genes (**Figura 8**). Na sorologia, um cachorro-do-mato do Zoológico de Araçatuba apresentou título de anticorpos de 64 (este mesmo animal também foi soropositivo para *E. canis* com um título de 1024) (**Tabela 8**).



**Figura 7.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE2/gE9f. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2 a 5: amostras de gatos-do-mato-pequeno positivas; Canaleta 6: branco (água ultra-pura esterilizada).



**Figura 8.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gene *groESL* para as amostras positivas para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. pelo gene *16S rRNA*. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo *E. canis*; Canaletas 3 a 27: amostras positivas para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. pelo gene *16S rRNA* e negativas na PCR para o gene *groESL*; Canaleta 28: amostra de canídeo selvagem positivo para *Anaplasma* sp. na nPCR para o gene *groESL*; Canaleta 29: branco (água ultra-pura esterilizada).

**Tabela 8.** Resultados da sorologia e PCR convencional para *Anaplasma* sp. de acordo com as espécies e instituições de origem dos carnívoros selvagens amostrados.

Espécie	Sorologia	PCR					
	<i>A. phagocytophilum</i>	16S rRNA <i>Anaplasma</i> sp.	<i>groESL</i>	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	<i>ftsZ</i>	<i>ankA</i>
<i>L. pardalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. tigrinus</i>	(1) IS, (1) NO	(4) Sor	-	-	-	-	-
<i>L. wiedii</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. colocolo</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. onca</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. concolor</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. yagouaroundi</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. tigris</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pardus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. caracal</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serval</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. leo</i>	(1) RP	-	-	-	-	-	-
<i>P. viverrinus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. venaticus</i>	-	-	(1) Pir	-	-	-	-
<i>C. thous</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. brachyurus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vetulus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lupus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. genetta</i>	-	-	-	-	-	-	-

AMC – Associação Mata Ciliar, Jundiá, São Paulo; SC – São Carlos Zoo, São Paulo; NO – Nova Odessa Zoo, São Paulo; Ped – Pedreira Zoo, São Paulo; Br – Brasília Zoo, Federal District; Le – Leme Zoo, São Paulo; Cps – Campinas Zoo, São Paulo; Bau – Bauru Zoo, São Paulo; Cui – Cuiabá Zoo, Mato Grosso; Cat – Catanduva Zoo, São Paulo; Rp – Ribeirão Preto, São Paulo; Ita – Itatiba Zoo, São Paulo; Am – Americana Zoo, São Paulo; Mg – Mogi Mirim Zoo, São Paulo; Ara – Araçatuba Zoo, São Paulo; Pir – Piracicaba Zoo, São Paulo; IS – Ilha Solteira Zoo, São Paulo; SP – São Paulo, São Paulo.

### 5.6. Sorologia e PCR para *Neorickettsia risticii*

Nenhum animal amostrado mostrou-se positivo na nPCR para *Neorickettsia risticii* baseada no gene 16S rRNA. Dos 167 felídeos selvagens amostrados, apenas um mostrou-se soropositivo para *N. risticii* (título de 128), representando provavelmente reação cruzada na sorologia com *E. canis* (título de 1024). Todos os canídeos selvagens amostrados mostraram-se soronegativos para *N. risticii*.

### 5.7. PCR para *E. ewingii*, *A. platys* e *N. helminthoeca*

Nenhum animal amostrado mostrou-se positivo nas PCRs para *E. ewingii*, *A. platys* e *N. helminthoeca* baseadas no gene 16S rRNA.

## 5.8. PCR multiplex para os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Bartonella*

### 5.8.1. Especificidade

Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise baseados no gene *groESL* para os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* foram desenhados utilizando-se o programa AlleleID6. Já para o gênero *Bartonella*, oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise foram desenhados baseados no gene *nuoG* (**Tabela 9**). Oligonucleotídeos iniciadores baseados nos genes *16S rRNA* e *gltA* mostraram-se não específicos. Em relação aos outros genes, tentativas na busca de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise mostraram-se infrutíferas, já que não satisfizeram as condições estipuladas pelo programa para uma PCR multiplex (comprimento e temperatura de “melting” de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise e tamanho do amplicon). Os oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene *groESL* e *nuoG* mostraram-se específicos para amplificação do DNA de espécies dos gêneros *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp., respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores baseados nos genes *16S rRNA* e *gltA* mostraram-se não específicos, amplificando cruzadamente DNA dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella*, *Neorickettsia* e *Rickettsia*.

**Tabela 9.** Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados na PCR multiplex em tempo real para os gêneros *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp.

Agentes	Gene-alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sonda de hidrólise (Probe TaqMan)
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>groESL</i>	5'-GCGAGCATAATTACTCAGAG-3' 5'-CAGTATGGAGCATGTAGTAG-3'	Cy-5- 5'-CCACCTTATCATTACTGAGACG-3'[BHQ2a-Q]3'
<i>Anaplasma</i> spp.	<i>groESL</i>	5'-TTATCGTTACATTGAGAAGC-3' 5'-GATATAAAGTTATTAATAAAGTATAAAGC-3'	TET- 5'-CATTGGCTCTTGCTATTGCTAAT-3'[BHQ2a-Q]3'
<i>Bartonella</i> spp.	<i>nuoG</i>	5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3' 5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3'	TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3'

### 5.8.2. Sensibilidade

A sensibilidade da PCR “singleplex” e “multiplex” foi avaliada utilizando-se plasmídeos com diferentes concentrações de DNA contendo a sequência alvo dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise. A sensibilidade da reação “singleplex” foi similar àquela da multiplex, demonstrando que os oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise desenhados no presente estudo podem ser usados simultaneamente em uma reação do tipo multiplex. O limite de detecção para detecção de DNA de espécies dos gêneros *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. e *Bartonella* sp. foi respectivamente de  $2,0 \times 10^1$  cópias/ $\mu\text{L}$ , de  $2,0 \times 10^2$  cópias/ $\mu\text{L}$  e de  $2,0 \times 10^3$  cópias/ $\mu\text{L}$ , respectivamente (Tabela 10).

**Tabela 10.** Características da PCR “singleplex” e “multiplex” para os gêneros *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp.

Agente	Eficiência (%) S/M*	Coefficiente de Correlação ( $R^2$ ) S/M*	Curva S/M*	Limite de detecção (número de cópias/ $\mu\text{L}$ ) S/M*
<i>Ehrlichia</i> spp.	88,8/95,3	0,987/0,994	-3,262/-3,44	$2,0 \times 10^2$ cópias/ $\mu\text{L}$
<i>Anaplasma</i> spp.	102,6/100	0,994/0,996	-3,262/3,322	$2,0 \times 10^1$ cópias/ $\mu\text{L}$
<i>Bartonella</i> spp.	112,1/109,7	0,989/0,995	-3,063/-3,11	$2,0 \times 10^3$ cópias/ $\mu\text{L}$

\*S/M: “singleplex”/multiplex

### 5.8.3. Resultados da PCR multiplex em tempo real das amostras de canídeos e felídeos para *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp.

Dezessete felídeos (10%) mostraram-se positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma* sp.: cinco jaguatiricas (três da AMC, uma do Zoológico de Bauru e uma do Zoológico de Itatiba), duas onças-pintada (uma do Zoológico de Ribeirão Preto e uma do Zoológico de Pedreira), dois leões (um do Zoológico de Americana e um do Zoológico de Bauru), dois gatos-do-mato-pequeno (um do Zoológico de Catanduva e um do Zoológico de Itatiba), três gatos-mourisco (um do Zoológico de Ilha Solteira, um do Zoológico de Bauru e um do Zoológico de Piracicaba), um tigre do Zoológico de Itatiba, um gato-palheiro do Zoológico de Sorocaba e um serval do Zoológico de São Paulo. Dez canídeos (10%) mostraram-se positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma* sp.: três cachorros-vinagre (dois do Zoológico de Cuiabá e um do Zoológico

de Piracicaba), três lobos-guará (um do Zoológico de Bauru e dois do Zoológico de São Paulo) e quatro cachorros-vinagre (um do Zoológico de Itatiba, um do Zoológico de Jaboticabal, um do Zoológico de Piracicaba e um do Zoológico de Ribeirão Preto). Apenas uma jaguatirica mostrou-se positiva na PCR em tempo real para *Ehrlichia* sp. Nenhum canídeo e felídeo selvagem mostrou-se positivo na PCR em tempo real para *Bartonella* sp.

### **5.9. Resultados da PCR em tempo real das amostras de canídeos e felídeos para *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. e *Orientia tsutsugamushi***

Nenhuma amostra positiva na PCR baseada no gene *16S rRNA* para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. mostrou-se positiva na PCR em tempo real específica para *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*). Da mesma forma, nenhum animal mostrou-se positivo para *Rickettsia* sp. do grupo da febre maculosa (gene *ompA*) e do tifo (gene da lipoproteína de 17kDa) e *Orientia tsutsugamushi* (gene da proteína externa de superfície de 56kDa).

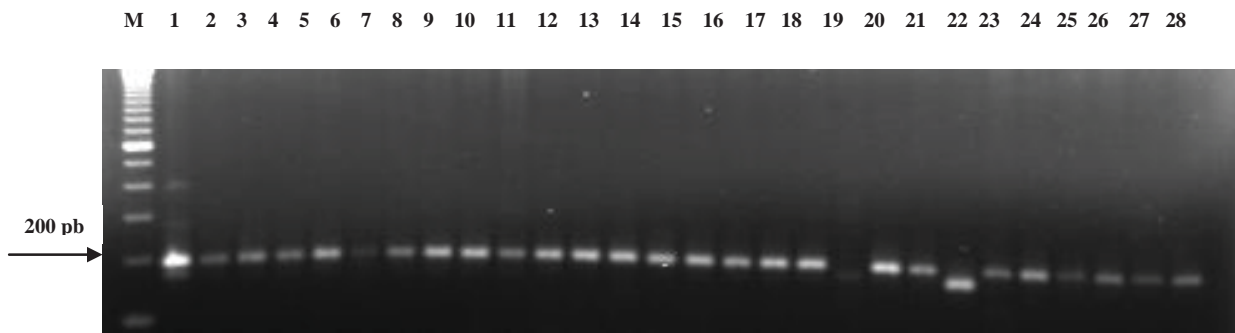
### **5.10. PCR para *Mycoplasma* sp.**

De todos os animais amostrados, 27 mostraram-se positivos para *Mycoplasma* sp. (**Figura 9**).

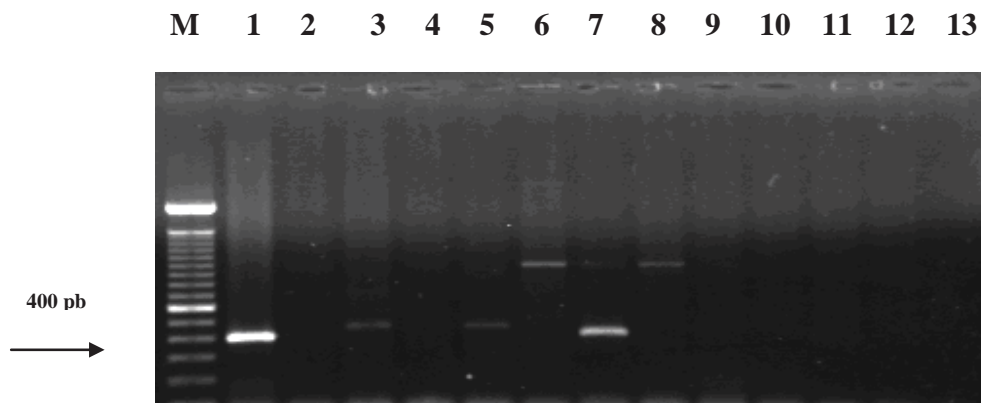
Dos 167 felídeos selvagens amostrados, 22 (13,2%) foram positivos na PCR para *Candidatus M. haemominutum* (gene *16S rRNA*): nove jaguatiricas, três gatos-mourisco e dois gatos-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí, uma onça-pintada, uma suçuarana e uma jaguatirica do Zoológico de Brasília, uma onça-pintada do Zoológico de Campinas, uma onça-pintada e uma suçuarana do Zoológico de Pedreira, uma onça-pintada do Zoológico de Ribeirão Preto e um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Sorocaba. Dois cachorros-vinagre foram positivos para *Candidatus M. haematoparvum* e dois lobos europeus foram positivos para *Candidatus M. haemominutum* (**Figura 10**). Apenas um felídeo (um gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí) mostrou-se positivo na PCR para *M. haemofelis* (gene *16S rRNA*) (**Figura 11**). Nenhum animal mostrou-se positivo na PCR para *Candidatus M. turicensis* (gene *16S rRNA*) (**Figura 12**).

Das 28 amostras positivas para *Mycoplasma* sp (incluindo canídeos e felídeos selvagens), 21 mostraram-se positivas na PCR para *Mycoplasma* sp. (gene *16S rRNA*) que amplifica um produto de 600pb (**Figura 13**). Os amplicons resultantes de uma PCR que amplifica um fragmento de 1750 pb do gene *16S rRNA* (**Figura 14**) foram utilizados para o alinhamento e construção de uma árvore filogenética. Entretanto, as amostras positivas para *Mycoplasma* sp. de canídeos selvagens mostraram-se negativas nesta PCR.

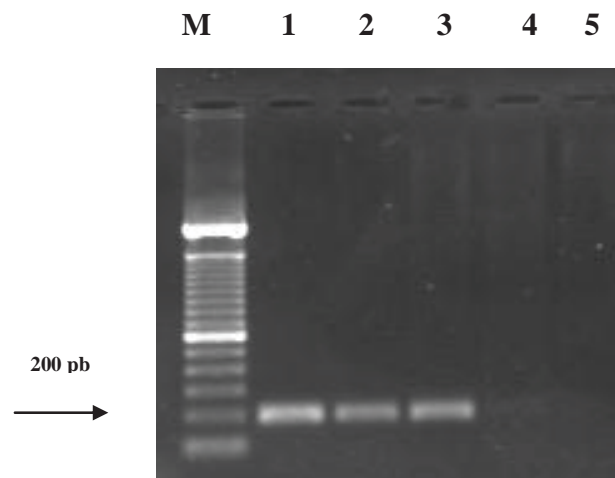
Na PCR para o gene *mnpb*, apenas três felídeos anteriormente positivos na PCR para *Mycoplasma* sp., baseada no gene *16S rRNA*, apresentaram produto amplificável (**Figura 15**).



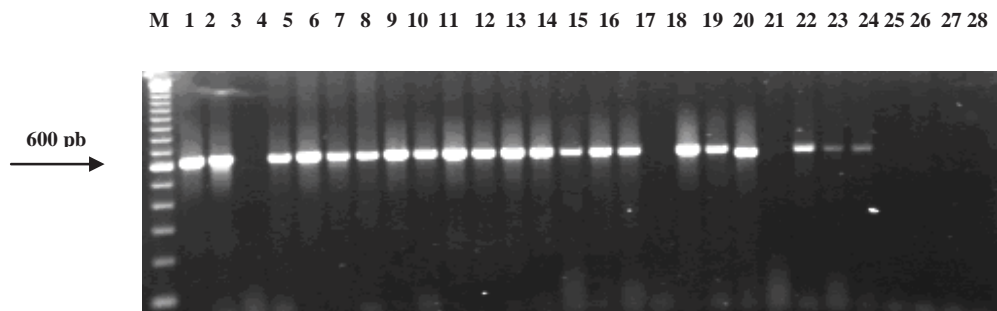
**Figura 9.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma* sp. (gene *16S rRNA*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2 a 27: amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas; Canaleta 28: branco (água ultra pura esterilizada).



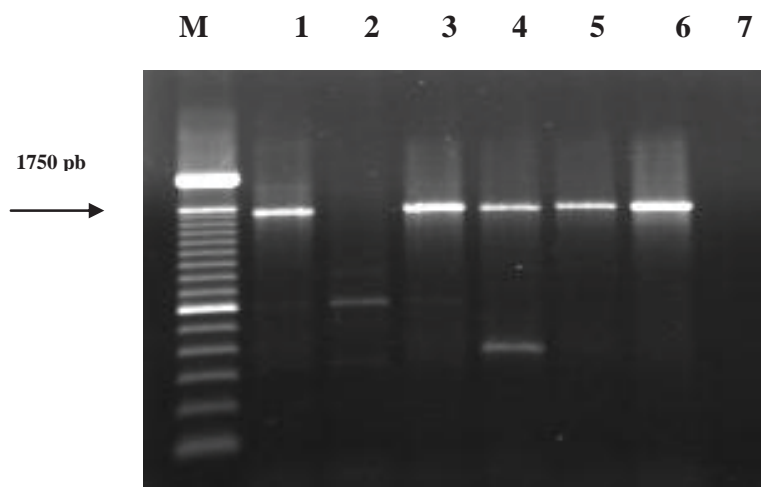
**Figura 10.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma haemofelis*/*M. haemocanis* (gene *16S rRNA*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 7: amostra de gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí positiva para *M. haemofelis*; Demais canaletas: amostras de canídeos e felídeos selvagens negativas para *M. haemofelis*; Canaleta 13: branco (água ultra pura esterilizada).



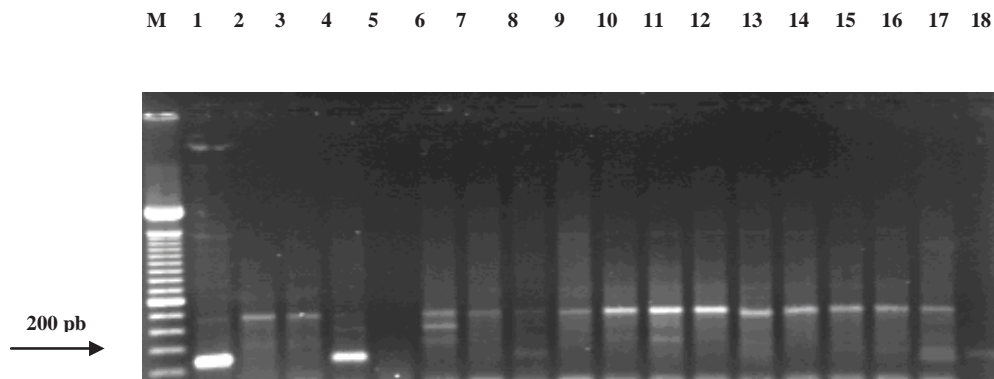
**Figura 11.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*/*M. haematoparvum* (*16S rRNA*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo *Candidatus Mycoplasma haemominutum*; Canaleta 2: amostra de gato-do-mato-pequeno da AMC de Jundiaí positiva para *M. haemominutum*; Canaleta 3: amostra de lobo-europeu do Zoológico de São Paulo positiva para *M. haemominutum*; Canaleta 4: amostra de felídeo selvagem negativa; Canaleta 5: branco (água ultra-pura esterilizada).



**Figura 12.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* (gene *16S rRNA*) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HBT-F e HBT-R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 e 2: amostras de felídeos selvagens positivas para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm); Canaletas 3, 17 e 21: amostras de felídeos positivas para CMhm, porém negativas na PCR em questão; Canaletas 4 a 16 e 18 a 20: amostras de felídeos selvagens positivas para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm); Canaleta 22: amostra de felídeo positiva para *M. haemofelis.*; Canaletas 23 e 24: amostras de canídeos positivas para *Mycoplasma sp.*; Canaletas 25 a 27. amostras de canídeos selvagens positivas para *Mycoplasma sp.*, porém negativas na PCR em questão; Canaleta 28: branco (água ultra-pura esterilizada).



**Figura 13.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* baseada no gene *16S rRNA* que amplifica um fragmento de 1750 pb. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1, 3, 4, 5 e 6: amostras de felídeos positivas para *Mycoplasma sp.*; Canaleta 2: amostra negativa; Canaleta 7: água ultra-pura esterilizada.



**Figura 14.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma sp.* baseada no gene *rnpb*. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaleta 4: amostra positiva para o gene *rnpb*; Demais canaletas: amostras de felídeos e canídeos positivas para o *Mycoplasma sp.* baseada no gene *16S rRNA* e negativas na PCR baseada no gene *rnpb*.

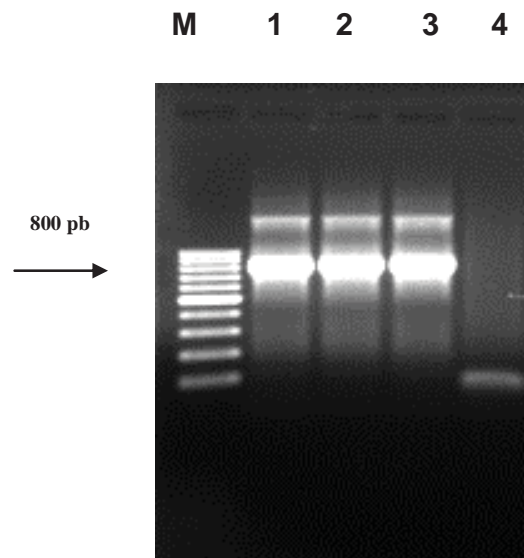
#### 5.11. Sorologia e PCR para *Babesia sp.*

Cinquenta e quatro felídeos (31%) e 10 canídeos (10%) mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *B. canis vogeli*. Anticorpos anti-*B. vogeli* foram detectados em 26 jaguatiricas (60%), nove gatos-do-mato-pequeno (24%), dois gatos-maracajá (50%), três gatos-palheiro (60%), seis onças-pintada (46%), duas suçuaranas (11%), seis gatos-mourisco (25%), dois cachorros-do-mato (5%) e em oito cachorros-vinagre (29%). Os títulos de anticorpos variaram de 40 (ponto de corte) a 10240 (**Tabela 11**).

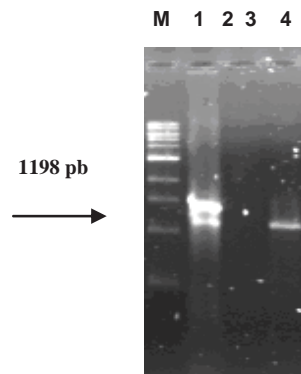
Um gato-palheiro da Associação Mata Ciliar de Jundiaí e uma geneta do Zoológico de Itatiba mostraram-se positivos na PCR para *Babesia sp.* para os genes *18S rRNA* (**Figura 15**) e *β-tubulina* (**Figura 16**). O gato-palheiro mostrou-se soropositivo para *B. canis vogeli* (título de 80).

**Tabela 11.** Títulos de anticorpos anti-*B. canis vogeli* em canídeos e felídeos selvagens amostrados mantidos em cativeiro.

Títulos de anticorpos anti- <i>B. canis vogeli</i>	Número de felídeos selvagens	Número de canídeos selvagens	Total
40	7	2	9
80	16	1	17
160	21	2	23
320	7	3	10
640	2	1	3
1280	1	-	1
2560	-	-	-
5120	-	-	-
10240	-	1	1
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>10</b>	<b>64</b>



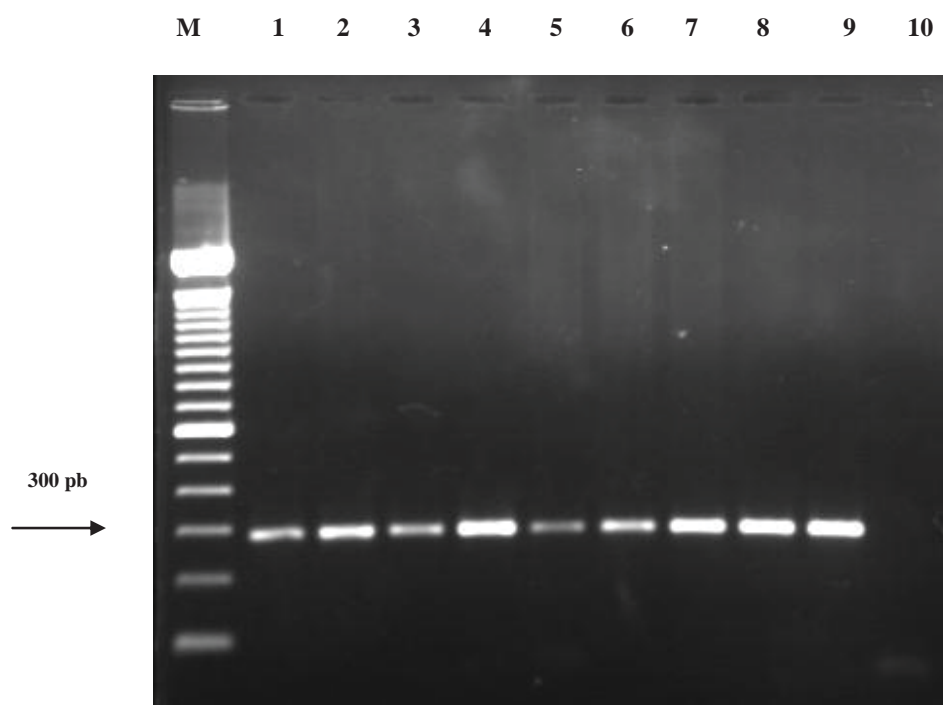
**Figura 15.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Babesia* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores BTF2/BTR2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo *B. canis*; Canaleta 2: amostra de gato-palheiro positivo; Canaleta 3: amostra de geneta postiva; Canaleta 4: branco (água ultra-pura esterilizada).



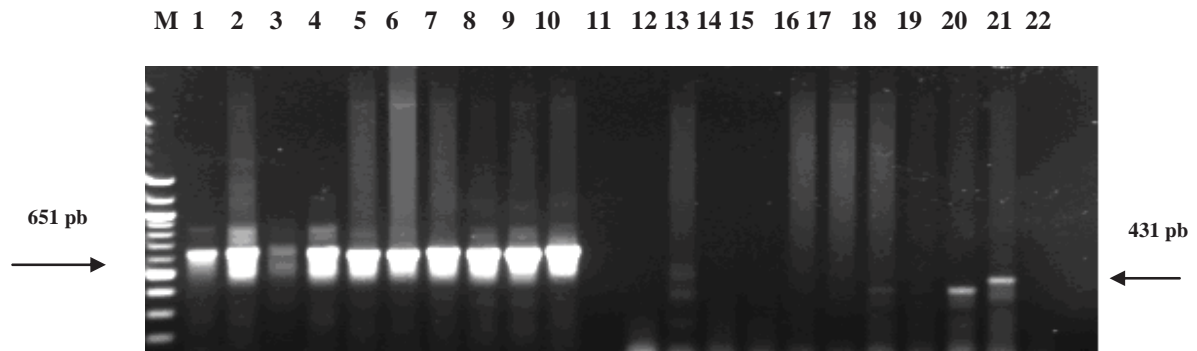
**Figura 16.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Babesia* sp (gene da  $\beta$ -*tubulina*) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Tubu-3 e Tubu-63F. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 1kb pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: amostra de sangue de gato-palheiro positiva para *Babesia* sp.; Canaleta 2: branco (água ultra-pura esterilizada); Canaleta 3: amostra de sangue de geneta positiva para *Babesia* sp.

### 5.12. PCR para *Cytauxzoon* sp.

Dos 167 felídeos selvagens amostrados, 21 (12,5%) mostraram-se positivos na PCR para *Cytauxzoon* sp. baseada no gene *18S rRNA*: duas suçuaranas, uma onça-pintada e duas jaguatiricas do Zoológico de Brasília, quatro jaguatiricas da Associação Mata Ciliar de Jundiá e uma suçuarana do Zoológico de Ribeirão Preto, uma suçuarana e uma jaguatirica do Zoológico de Americana, uma onça-pintada do Zoológico de Bauru, uma suçuarana do Zoológico de Catanduva, uma jaguatirica do Zoológico de Itatiba, um gato-do-mato pequeno do Zoológico de Nova Odessa, duas jaguatiricas e um gato-do-mato pequeno do Zoológico de Piracicaba, um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Ribeirão Preto, um gato-mourisco do Zoológico de São Carlos e um tigre do Zoológico de São Paulo (**Figura 17**). Dos 21 felinos selvagens positivos na PCR para *Cytauxzoon* sp. baseada no gene *18S rRNA*, 13 também foram positivos na PCR para *Cytauxzoon* sp baseada região intergênica 1 (ITS-1). Por outro lado, somente cinco animais apresentaram produto amplificado na PCR para a região intergênica 2 (ITS-2) de *Cytauxzoon* sp. (**Figura 18**).



**Figura 17.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Cytauxzoon sp.* (gene 18SrRNA). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 a 7: amostras de jaguatiricas positivas. Canaletas 8 e 9: amostras de suçuaranas positivas. Canaleta 10: branco (água ultra-pura esterilizada).



**Figura 18.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Cytiauxzoon* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1-F; ITS1-R, ITS2-F e ITS-2R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1 a 10: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene 18SrRNA de *Cytiauxzoon* sp. e também positivas na PCR para a região intergênica-1. Canaleta 11: branco (água ultra-pura esterilizada); Canaletas 12 a 19: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene 18S rRNA de *Cytiauxzoon* sp. e negativas na PCR para *Cytiauxzoon* sp. baseada na região intergênica-2; Canaletas 20 e 21: amostras de felídeos positivas na PCR para o gene 18SrRNA de *Cytiauxzoon* sp. e também positivas na PCR baseada na região intergênica-2; Canaleta 22: branco (água ultra-pura esterilizada).

Oito animais mostraram-se soropositivos para *B. vogeli* e positivos na PCR para *Cytiauxzoon* sp., demonstrando uma reação cruzada entre estes dois piroplasmas (Tabela 12).

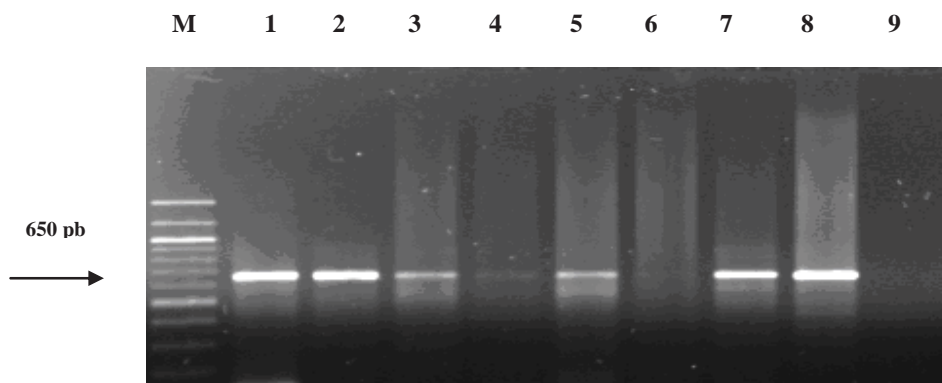
**Tabela 12.** Correlação entre os resultados da PCR para *Cytiauxzoon* sp. (baseada no gene 18S rRNA) e sorologia para *B. canis vogeli* para os felídeos selvagens em cativeiro amostrados.

	Animais sororeagentes a <i>B. canis vogeli</i>	Animais não-sororeagentes a <i>B. canis vogeli</i>	Total
Animais positivos na PCR para <i>Cytiauxzoon</i> sp.	8	13	21
Animais negativos na PCR para <i>Cytiauxzoon</i> sp.	45	101	146
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>114</b>	<b>167</b>

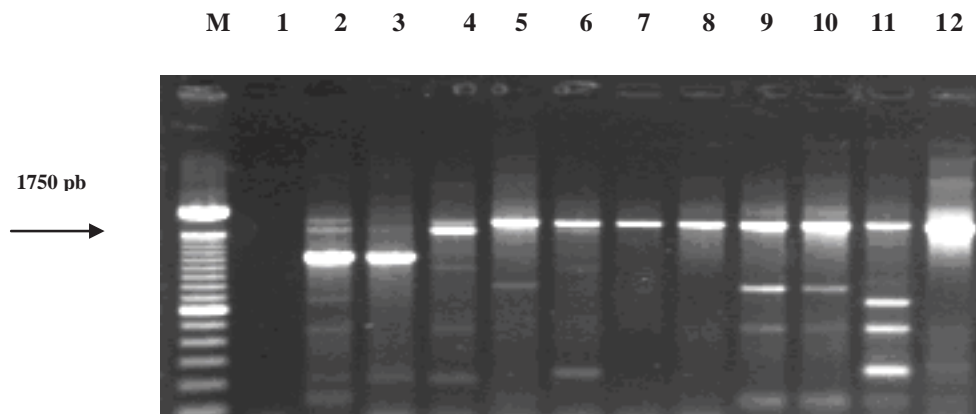
Somente um animal (jaguatirica – Zoológico de Brasília) apresentou-se simultaneamente positivo na PCR para *Cytauxzoon sp.* e soropositivo para *E. canis*. Nenhum animal positivo para *Cytauxzoon sp.* mostrou-se simultaneamente soropositivo para *A. phagocytophilum*.

### 5.13. PCR para *Hepatozoon sp.*

Dos 167 felídeos selvagens amostrados, seis mostraram-se positivos na PCR para *Hepatozoon sp.* baseada no gene *18S rRNA*: um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Brasília, três gatos-do-mato- da Associação Mata Ciliar de Jundiá e uma suçuarana do Zoológico de Ribeirão Preto, um gato-mourisco de Zoológico de Ilha Solteira e uma suçuarana do Zoológico de Sorocaba (**Figura 19**). Dentre os canídeos selvagens amostrados, seis foram positivos na PCR para *Hepatozoon sp.*: um cachorro-vinagre do Zoológico de Cuiabá e um do Zoológico de São Paulo, uma raposa do Zoológico de Ribeirão Preto, um lobo-guará do Zoológico de Sorocaba e um cachorro-do-mato do Zoológico de Piracicaba. Para um alinhamento múltiplo, uma PCR que amplifica um fragmento maior do gene *18S rRNA* (1750 pb) foi realizada (**Figura 20**) com as amostras positivas na PCR para *Hepatozoon sp.*



**Figura 19.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Hepatozoon sp.* (gene 18SrRNA) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HEP-F e HEP-R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1: controle positivo (*Hepatozoon canis*); Canaleta 2: amostra positiva de um gato-do-mato-pequeno do Zoológico de Brasília; Canaletas 3 a 5: amostras positivas de gatos-do-mato-pequeno de Jundiaí; Canaleta 6: amostra negativa de felino; Canaleta 7: amostra positiva de gato mourisco do Zoológico de Ilha Solteira; Canaleta 8: amostra positiva de suçuarana do Zoológico de Sorocaba. Canaleta 9: branco (água ultra pura esterilizada).



**Figura 20** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Hepatozoon sp.* (gene 18SrRNA) obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HAM-1 e HPF-2R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: branco (água ultra pura esterilizada); Canaletas 2 a 11: amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas para *Hepatozoon sp.*; Canaleta 12: controle positivo (*Hepatozoon canis*).

## 5.14. Análise da similaridade das sequências pelo BLAST

### 5.14.1. Análise das sequências de *Ehrlichia* sp.

Os amplicómeros obtidos na PCR para *Ehrlichia* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores HE3/ECAN, baseados no gene *16S rRNA*, a partir de amostras de sangue dos felídeos selvagens revelaram 98-99% de identidade entre si e altos graus de identidade com seqüências previamente publicadas no GenBank. As amostras de DNA de *Ehrlichia* sp. encontradas apresentaram identidade de 98%-99% com sequências de *E. canis* encontradas em cães do México (número de acesso EF424612), Brasil (número de acesso EF195134), Portugal (EF051166), Tailândia (EF139458), Grécia (EF011111), Taiwan (EU178797) e gatos do Taiwan (EU143637). Já os amplicómeros obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CHAFF e GA1UR mostraram 99% de identidade com a amostra Arkansas de *E. chaffeensis* (AF416764) **(Tabela 13)**.

Os amplicómeros obtidos com o uso de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *omp-1* a partir das amostras de sangue de felídeos selvagens mostraram 97% de identidade com a amostra Jaboticabal de *E. canis* (EF014897), e 97% de identidade com as amostras Jake, Estados Unidos (CP000107) e São Paulo (DQ460713) **(Tabela 13)**.

As amostras de canídeos selvagens positivas na PCR para *Ehrlichia* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos CHAFF e GA1UR, baseados no gene *16S rRNA*, mostraram 98% de identidade com a amostra Arkansas de *E. chaffeensis* (AF416764). Já aquelas amostras positivas na PCR para *Ehrlichia* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos ECAN-5 e HE-3, baseados no gene *16S rRNA*, mostraram identidade de 99% com uma amostra de *E. canis* isolada de cães da Tunísia (EU781695) **(Tabela 13)**.

O amplicómero obtido na PCR para *Ehrlichia* sp. (utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene *dsb*) a partir de uma amostra de sangue de canídeo selvagem mostrou 99% de identidade com uma amostra de *E. canis* isolada de um cão de Uberlândia (GU586135) e amostra Jake (CP000107). Esta mesma amostra, quando submetida à amplificação pelo gene *omp-1*, mostrou identidade de 82% com as

amostras Jaboticabal de *E. canis* (EF014897), Jake, Estados Unidos (CP000107) e São Paulo (DQ460713) (**Tabela 13**).

#### **5.14.2. Análise das seqüências de *Anaplasma* spp.**

Os amplímeros obtidos na PCR para *Anaplasma* sp. (utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores gE2/gE9f baseados no gene *16S rRNA*) revelaram 97-99% de identidade com seqüências de *A. phagocytophilum* previamente publicadas no GenBank encontradas em carrapatos no Japão (AY969015), em cães da Áustria (AF507941), em eqüinos da República Tcheca (EU839857), em carrapatos *Ixodes ricinus* na Turquia (FJ172530), em carrapatos em Portugal (EU098007), dentre outros isolados do agente (AY055469, AY242785, AJ242785, CP 000235). O amplímero obtido pela amplificação do gene *groESL* (utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores HSVR/HS43) mostrou 99% de similaridade com *A. phagocytophilum* (CP000235) (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Similaridade de amplicons obtida pelo BLAST® para amostras positivas nas PCRs para agentes Anaplasmataceae.

Agente	(Número de animais positivos) espécie	(Número de animais positivos) Zoológico	Gene alvo	Máxima similaridade(BLAST®) %
<i>Ehrlichia</i> spp.	(4) gato-do-mato-pequeno, (8) jaguatiricas, (2) gato-mourisco, (2) leão, (3) suçuarana, (2) onça-pintadas, (4) cachorro-vinagre, (3) cachorro-do-mato	(7) Jundiá, (2) Itatiba, (4) Piracicaba, (1) Brasília, (2) Nova Odessa, (2) Americana, (1) Bauru, (1) Catanduva, (1) Pedreira, (1) Campinas, (2) Ribeirão Preto, (1) Araçatuba, (2) Cuiabá	16S rRNA	<i>Ehrlichia canis</i> – cães do México (EF424612), Brasil (EF195134) e gatos de Taiwan (EU143637) – 98 - 99%
	(4) gato-do-mato-pequeno, (2) jaguatirica, (2) suçuarana, (1) tigre, (2) gato-mourisco, (1) leão, (3) cachorro-do-mato, (1) lobo-europeu	(1) Ilha Solteira, (6) Sorocaba, (1) São Carlos, (2) Bauru, (3) Piracicaba, (1) Araçatuba, (1) São Paulo, (1) Ribeirão Preto, (2) Cuiabá	16S rRNA	<i>Ehrlichia chaffeensis</i> - amostra Arkansas (AF416764) – 98%
	(1) cachorro-do-mato	(1) Piracicaba	dsb	<i>Ehrlichia canis</i> - Uberlândia (GU586135) e amostra Jake (CP000107) – 99%
	(1) onça-pintada, (3) jaguatiricas, (1) cachorro-do-mato	(1) Pedreira, (2) Jundiá, (1) Piracicaba	omp-1	<i>Ehrlichia canis</i> – amostras Jaboticabal (EF014897), São Paulo (DQ460713) e Jake, Estados Unidos (CP000107) – 97%
<i>Anaplasma</i> spp.	(4) gato-do-mato-pequeno	(4) Sorocaba	16S rRNA	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> - carrapatos no Japão (AY969015), cães da Áustria (AF507941), eqüinos da República Tcheca (EU839857) – 97-99%
	(1) cachorro-vinagre	(1) Piracicaba	groESL	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> – amostra HZ (CP000235) – 99%

### 5.14.3. Análise das sequências de *Mycoplasma* sp.

O seqüenciamento dos amplicons obtidos na PCR para *Mycoplasma* sp. utilizando-se diferentes pares de oligonucleotídeos que amplificam fragmentos do gene 16S rRNA, seguido da avaliação da similaridade pelo BLAST, confirmou a presença de infecção por *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* entre os felídeos selvagens amostrados. Ainda, mostrou a presença de DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus M. haematoparvum* em amostras de sangue

dos canídeos selvagens amostrados (**Tabela 14**). O sequenciamento de um fragmento de aproximadamente 200 pares de base do gene *mpb* evidenciou 100% de similaridade com *M. haemofelis* (AF407210) em um gato-do-mato-pequeno, 81% com *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (EU078614) em uma jaguatirica e 79% com *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (EU078616) em um gato-mourisco.

**Tabela 14.** Identidade verificada pelo programa BLAST<sup>®</sup> para as amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas para *Mycoplasma* sp em PCRs baseadas no gene 16S *rRNA*.

Hemoplasmas	(Número de animais positivos) Espécies	(Número de animais positivos) Localização	Máxima % de identidade pelo BLAST <sup>®</sup> – gene 16S <i>rRNA</i>
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	(1) gato-do-mato-pequeno	(1) Jundiá	<i>Mycoplasma haemofelis</i> – gatos da Itália (EU839978)– 99%
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	(4) onça (3) puma (10) jaguatirica (2) gato-mourisco (3) gato-do-mato-pequeno	(2) Pedreira (1) Campinas (3) Brasília (1) Ribeirão Preto (15) Jundiá (1) Sorocaba	<i>Candidatus M. haemominutum</i> gatos da Itália (EU839984)– 99%
	(2) lobo-europeu	(2) São Paulo	<i>Candidatus M. haemominutum</i> - cães da China (AM691834) - 99%
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	(2) cachorro-vinagre	(2) São Paulo	<i>Candidatus M. haematoparvum</i> case do Mediterrâneo (DQ129113)– 99%

#### 5.14.4. Análise das sequências de *Babesia* sp.

O DNA de *Babesia* sp. (amplicon obtido pela amplificação do gene 18S *rRNA*) encontrado na geneta (número de acesso HQ187782) e no gato-palheiro (HQ187781) mostrou 97-99% de similaridade com isolados de *Babesia leo* de gatos (AY452708) e leões (AF244911) da África do Sul. Os amplicons obtidos na PCR para piroplasmídeos baseada no gene da  $\beta$ -*tubulina* mostrou 85% de identidade com *Babesia microti* (AY144708).

#### 5.14.5. Análise das sequências de *Cytauxzoon* sp.

Os amplicómeros obtidos na PCR para *Cytauxzoon* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene *18S rRNA* (BIRHENHEUER et al., 2005), revelaram 98% de identidade com *C. felis* encontrado em um gato-do-mato-pequeno brasileiro (DQ382277), 97% de identidade com isolados de *C. felis* de gatos domésticos dos Estados Unidos (AF399930, AY679105, L19080), 91% de identidade com *Cytauxzoon* sp. encontrado em lincos ibéricos (AY496273) e com *Cytauxzoon manul* (AY485691, AY485690).

Os amplicómeros obtidos na PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores baseados nas regiões intergênicas ITS-1 e ITS-2 (BROWN et al., 2009) revelaram porcentagens de identidade de 98% (AY679105), 97%(AY531524), 94% (DQ458797), 93% (AY158898), 91%(AY450803) e 90% (AY669146) com outros isolados de *C. felis*.

#### 5.14.6. Análise das sequências de *Hepatozoon* sp.

A identidade dos amplicons (fragmento de 1750 pb) obtidos na PCR para *Hepatozoon* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores HAM-1F e HPF-2R com amostras depositadas no GenBank está mostrada na **Tabela 15**. O DNA de *Hepatozoon* sp. encontrado nos felídeos selvagens amostrados mostrou identidade com *Hepatozoon felis*. Por outro lado, o DNA de *Hepatozoon* sp. detectado nos canídeos selvagens amostrados apresentou identidade com *H. canis* e *Hepatozoon* sp. isolado Curupira-2 (filogeneticamente relacionado a *H. americanum*).

**Tabela 15.** Identidade verificada pelo programa BLAST® para as amostras de canídeos e felídeos selvagens positivas na PCR para *Hepatozoon* sp.

Animal	Número	Localização	Máxima % de identidade pelo BLAST (gene <i>18S rRNA</i> )
Gato-do-mato-pequeno	#F18	Brasília	<i>H. felis</i> Spain 2 (AY628681) – 96%
Gato-do-mato-pequeno	#F56	Jundiaí	<i>H. felis</i> Spain 2 – AY628681 – 95%
Gato-do-mato-pequeno	#F57	Jundiaí	<i>H. felis</i> Spain 2 – AY628681 – 92%
Gato-do-mato-pequeno	#F72	Jundiaí	<i>H. felis</i> Spain 2 – AY628681 – 97%
Gato-mourisco	#F84	Ilha Solteira	<i>H. felis</i> Spain 2 – AY628681 – 96%
Puma	#F88	Sorocaba	<i>H. felis</i> Spain 2 – AY628681 – 97%
Cachorro-vinagre	#C8	São Paulo	<i>H. canis</i> Spain 1 - AY150067 – 92%
Cachorro-vinagre	#C15	Cuiabá	<i>Hepatozoon</i> sp. Curupira 2 – AY461377 – 86%
Raposinha	#C20	Ribeirão Preto	<i>H. canis</i> Spain 1 - AY150067 – 98%
Cachorro-do-mato	#C74	Piracicaba	<i>Hepatozoon</i> sp. Curupira 2 – AY461377 – 96%
Lobo-guará	#C98	Sorocaba	<i>H. canis</i> Spain 1 - AY150067 – 97%

### 5.15. Filogenia

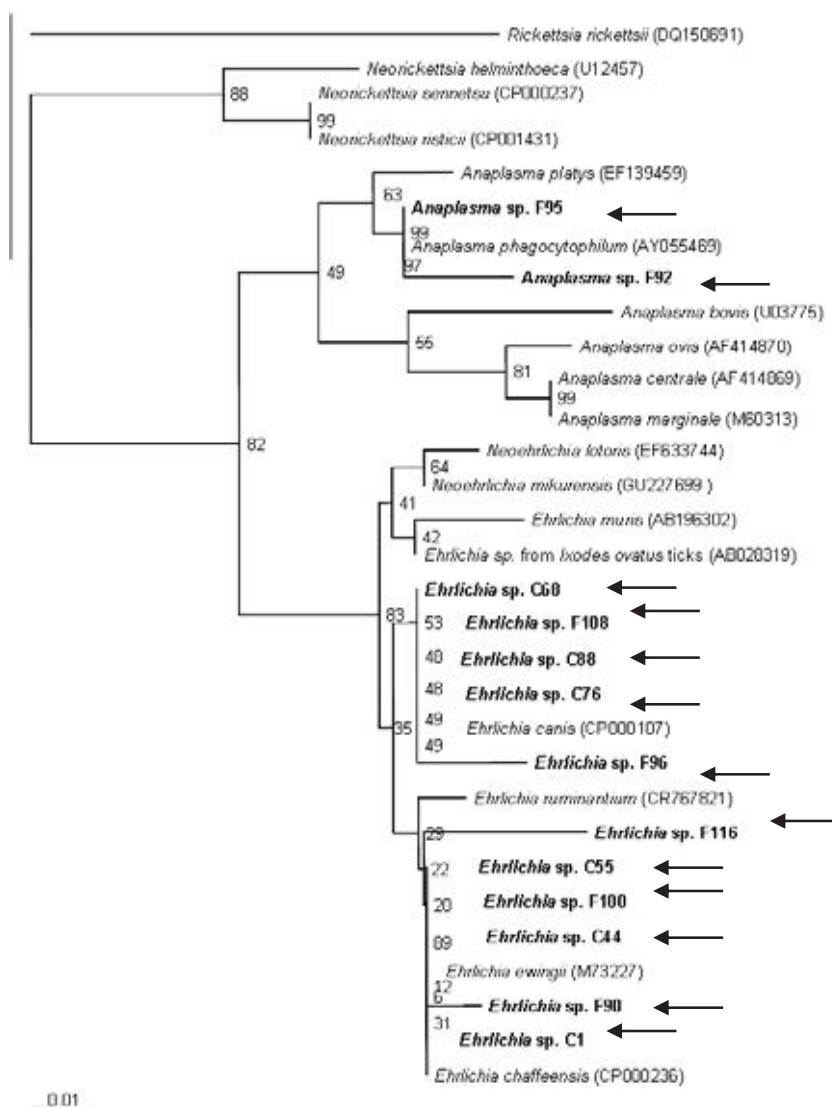
As árvores filogenéticas para agentes Anaplasmataceae baseadas nos genes *16S rRNA*, *omp-1*, *dsb* e *groESL* estão representadas nas **Figuras 21 a 24**. O DNA de *Anaplasma* spp. encontrado nos gatos-do-mato foi posicionado no mesmo ramo que *A. phagocytophilum* e *A. platys* na árvore filogenética baseada no gene *16S rRNA*. A análise filogenética baseada em 350 pb do gene *16S rRNA* não foi suficientemente robusta para diferenciar entre as espécies de *Ehrlichia* spp. (96,6 a 100% de identidade) (**Figura 21**). Os fragmentos de DNA de *Ehrlichia* spp. obtidos a partir da amplificação do DNA extraído de amostras de sangue dos animais sob estudo foram posicionados em um ramo distinto daquele de *E. canis* e *E. chaffeensis*, com base na análise filogenética do gene *omp-1* (**Figura 22**). A análise filogenética baseada no gene *dsb* confirmou a presença de DNA de *E. canis* em um cachorro-do-mato (**Figura 23**). Ainda, a análise filogenética do gene *groESL* posicionou o DNA de *Anaplasma* sp. detectado em um cachorro-vinagre no mesmo ramo que *A. phagocytophilum* e *A. bovis* (**Figura 24**).

Em relação à análise filogenética do DNA de hemoplasmas baseada no gene *16S rRNA*, o isolado de *M. haemofelis* encontrado em um gato-do-mato-pequeno posicionou-se no mesmo ramo que *M. haemofelis* e *M. haemocanis*. O isolado de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* encontrado em uma jaguatirica posicionou-se no mesmo ramo que um isolado de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (U88564). Já o isolado de *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* encontrado em um cachorro-vinagre posicionou-se no mesmo ramo que outro isolado de *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (AY383241) (**Figura 25**). Na árvore filogenética baseada em sequências do gene *mpB* verificou-se que enquanto o fragmento de DNA de *M. haemofelis* encontrado em um gato-do-mato-pequeno foi posicionado no mesmo ramo que um isolado de *M. haemofelis* (AF407210). Os fragmentos de DNA de *Candidatus M. haemominutum* encontrado em felídeos selvagens foi posicionado no mesmo ramo que isolados de *Candidatus M. haemominutum* (EU078616) e *Candidatus M. haematoparvum* (EU07864) (**Figura 26**). Interessantemente, um dos fragmentos de DNA de hemoplasma detectado em um gato-mourisco (F66) foi posicionado em um sub-ramo mais próximo a *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (**Figura 26**).

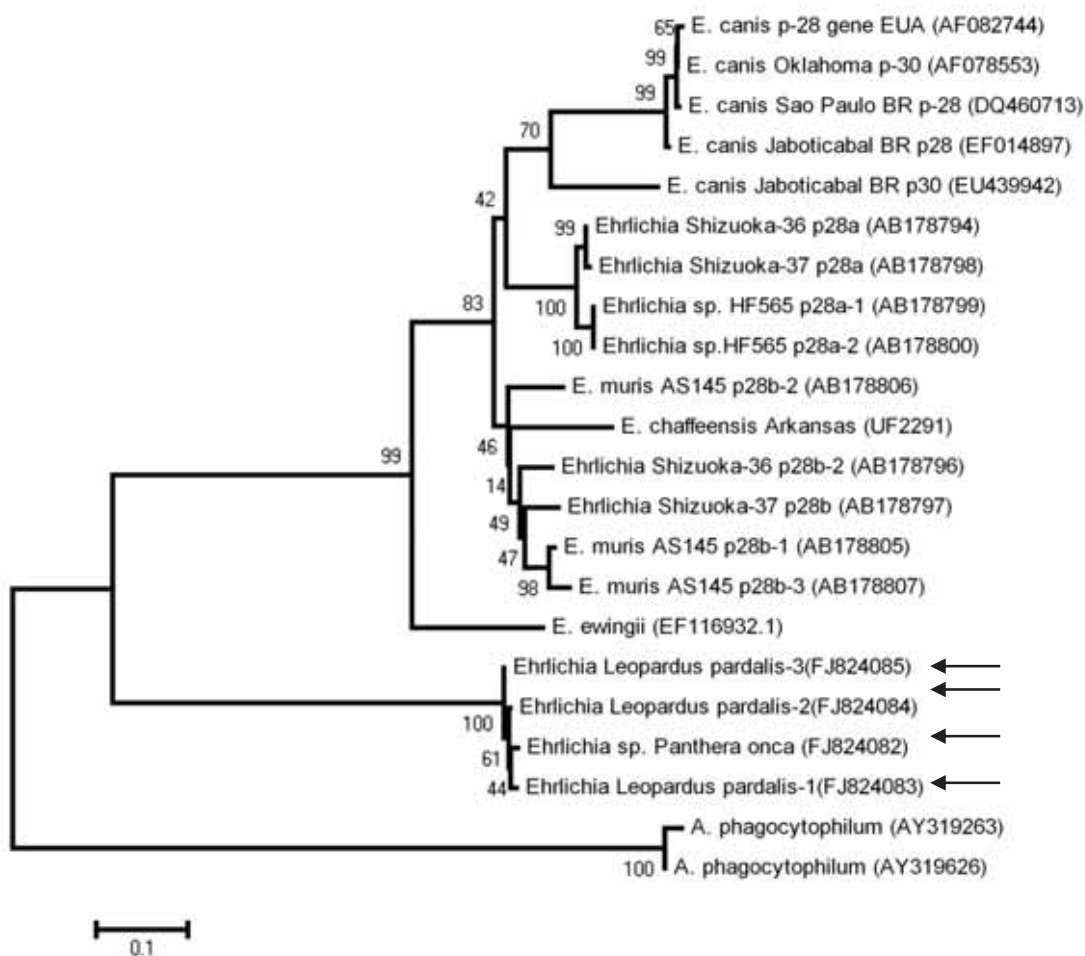
A análise filogenética baseada no gene *18S rRNA* para os isolados de *Babesia* sp. encontrados em um gato-palheiro e em uma geneta mostrou que os mesmos se posicionaram no mesmo ramo que *B. leo* (**Figura 27**). Quando a análise filogenética foi baseada no gene da  $\beta$ -*tubulina*, os fragmentos de DNA de *Babesia* sp. amplificados no presente estudo se posicionaram no mesmo ramo que *Babesia microti* (**Figura 28**), uma vez que sequências do gene da  $\beta$ -*tubulina* de *B. leo* não foram encontrados no GenBank.

A análise filogenética do gene *18S rRNA* para isolados de *Cytauxzoon* spp. demonstrou claramente a existência de dois grupos: *C. felis* e *C. manul*, com a inserção dos isolados brasileiros de *Cytauxzoon* sp. posicionados no mesmo ramo de *C. felis* (**Figura 29**). No presente estudo, o isolado de *Cytauxzoon* sp. de uma puma do Zoológico de Ribeirão Preto foi posicionada no mesmo ramo que *C. felis* nas árvores filogenéticas baseadas nas regiões intergênicas 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) (**Figuras 30 e 31**). Por outro lado, os outros isolados de *Cytauxzoon* sp. encontrados no presente estudo formaram um ramo separado (baseadas em sequências de ITS-1), sugerindo a existência de variantes genotípicas de uma mesma espécie (**Figuras 30 e 31**). Tais diferenças não foram observadas na árvore filogenética do *18S rRNA*, já que se trata de um gene mais conservado.

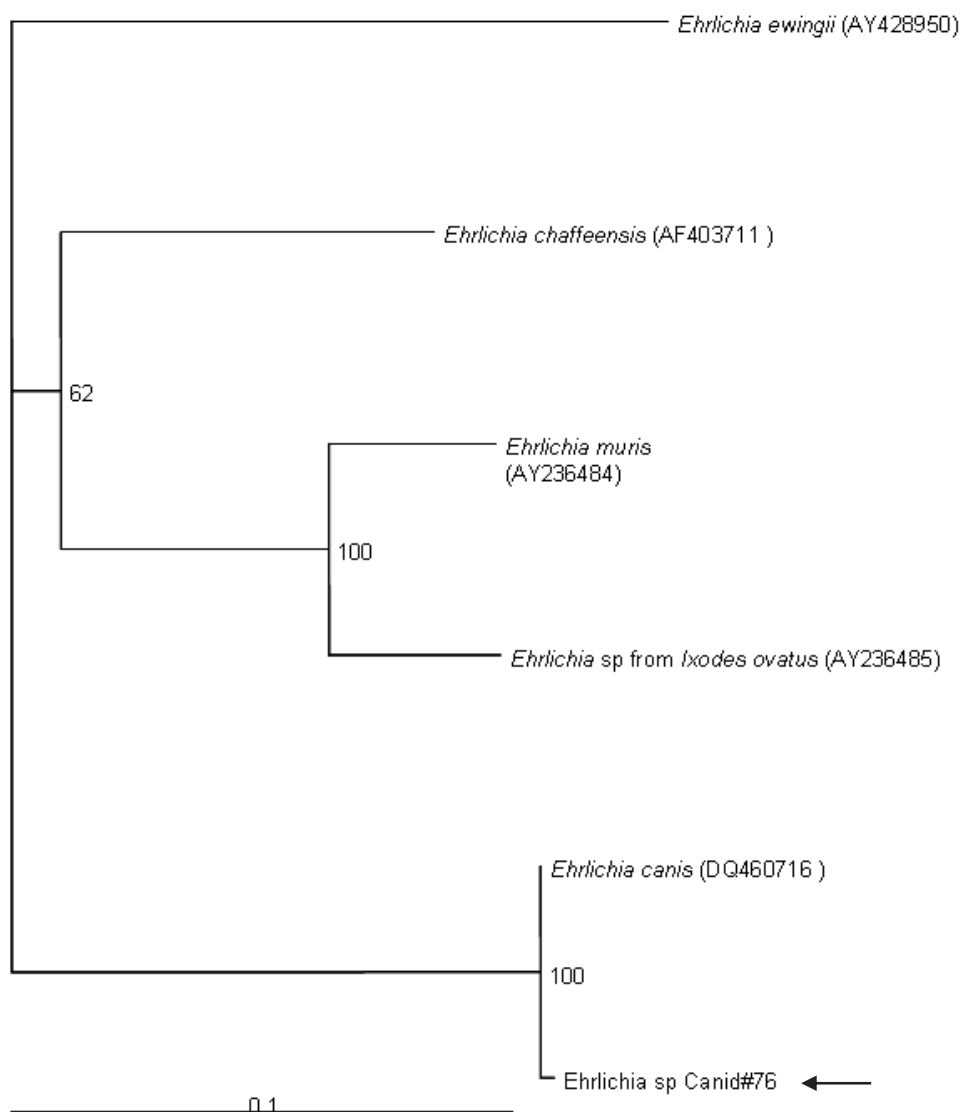
Quando a análise filogenética foi realizada para isolados de *Hepatozoon* sp. (e utilizando-se *Perkinsus marinus* como “outgroup”), dois clusters distintos foram observados: um deles formado por isolados de *Hepatozoon* spp. encontrados em canídeos e felídeos do presente estudo (com exceção de um isolado de *Hepatozoon* sp. encontrado em um cachorro-do-mato que foi posicionado no mesmo ramo que o isolado Curupira 2 de *H. americanum*); o segundo cluster foi formado por isolados prévios de *Hepatozoon* spp. encontrado em carnívoros, roedores e vertebrados inferiores e do Brasil, Estados Unidos e Europa (**Figura 32**).



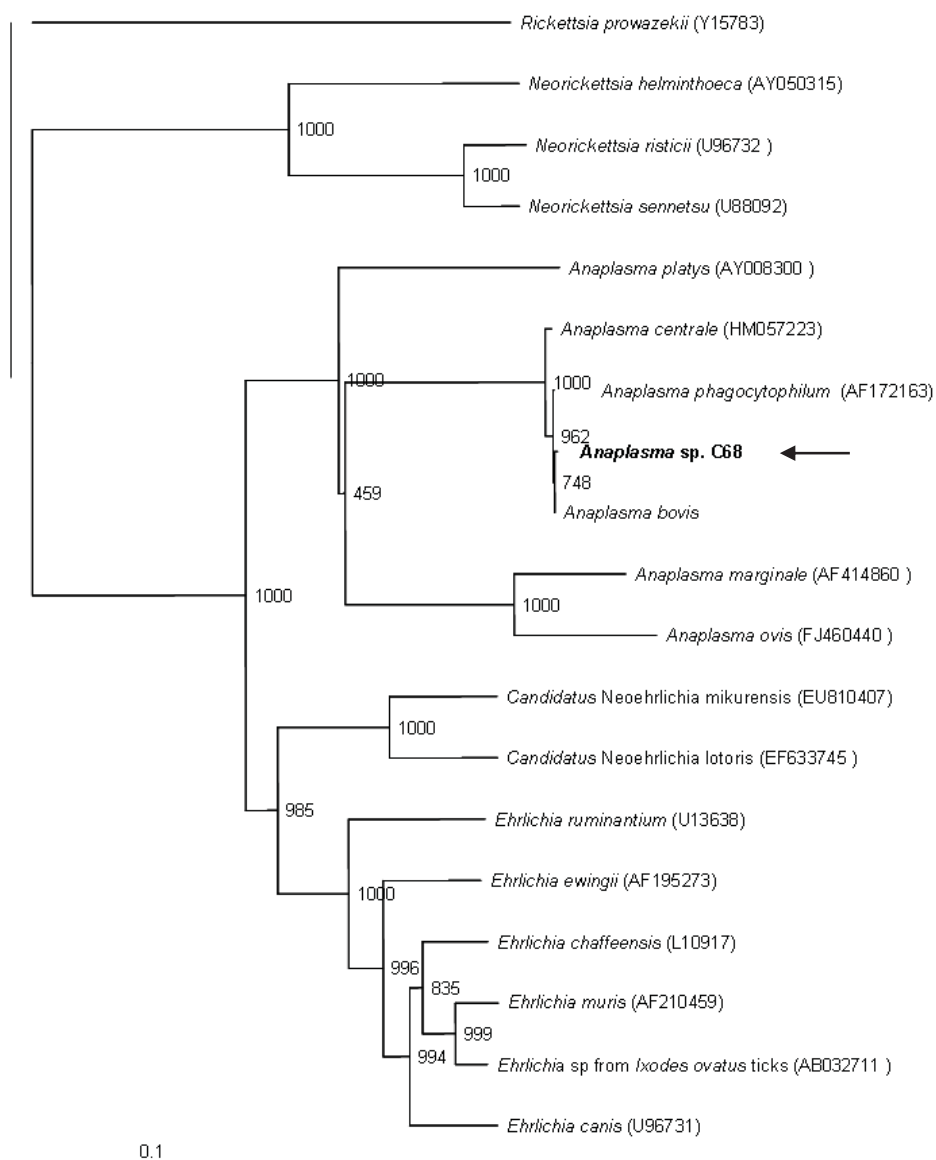
**Figura 21.** Posição filogenética de isolados de *Ehrlichia* spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene 16SrRNA (350pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências se encontram entre parênteses.



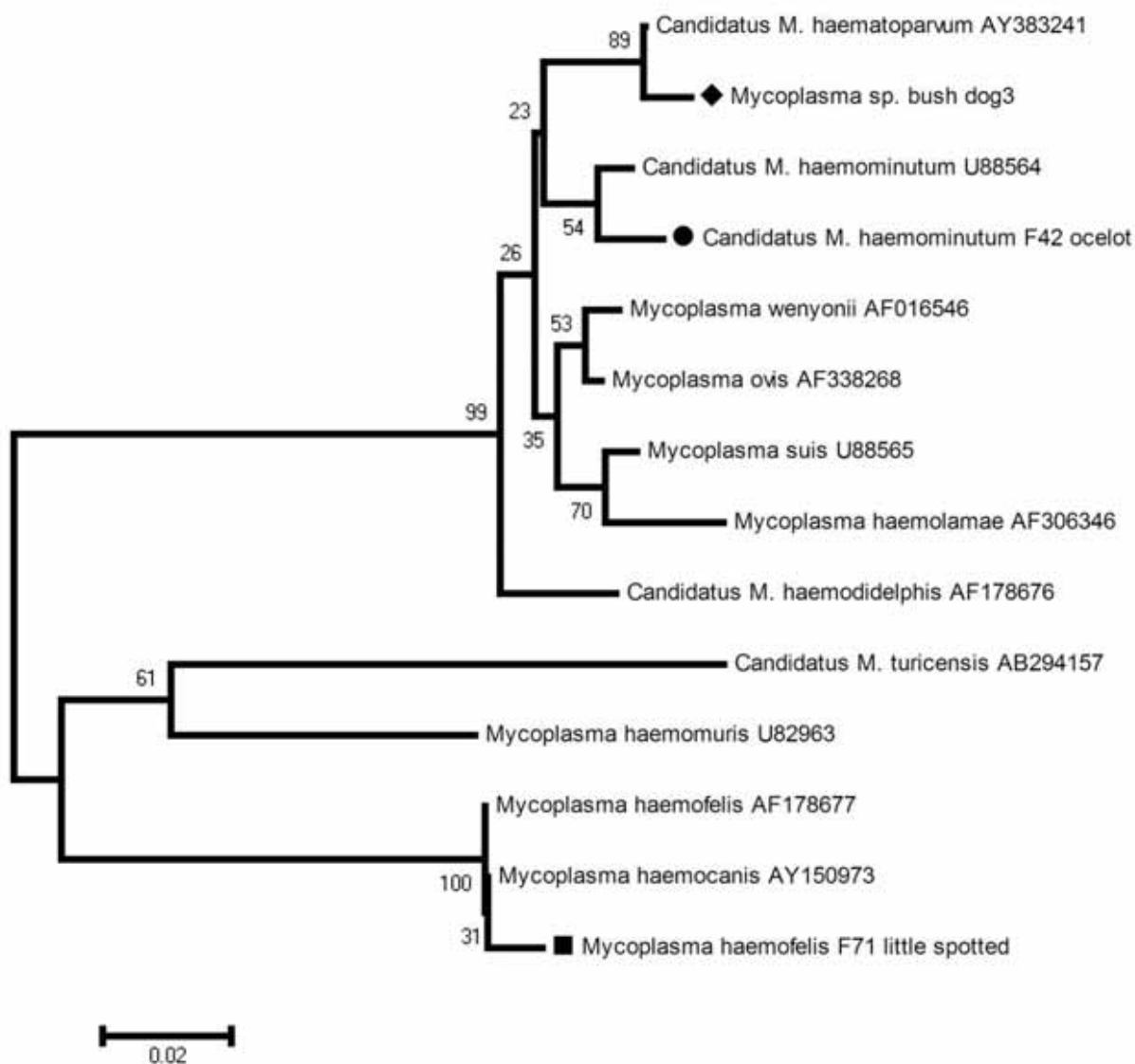
**Figura 22.** Posição filogenética de isolados de *Ehrlichia* spp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene *omp-1* (309pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap (100 replicações). Os números de acesso das sequências se encontram entre parênteses.



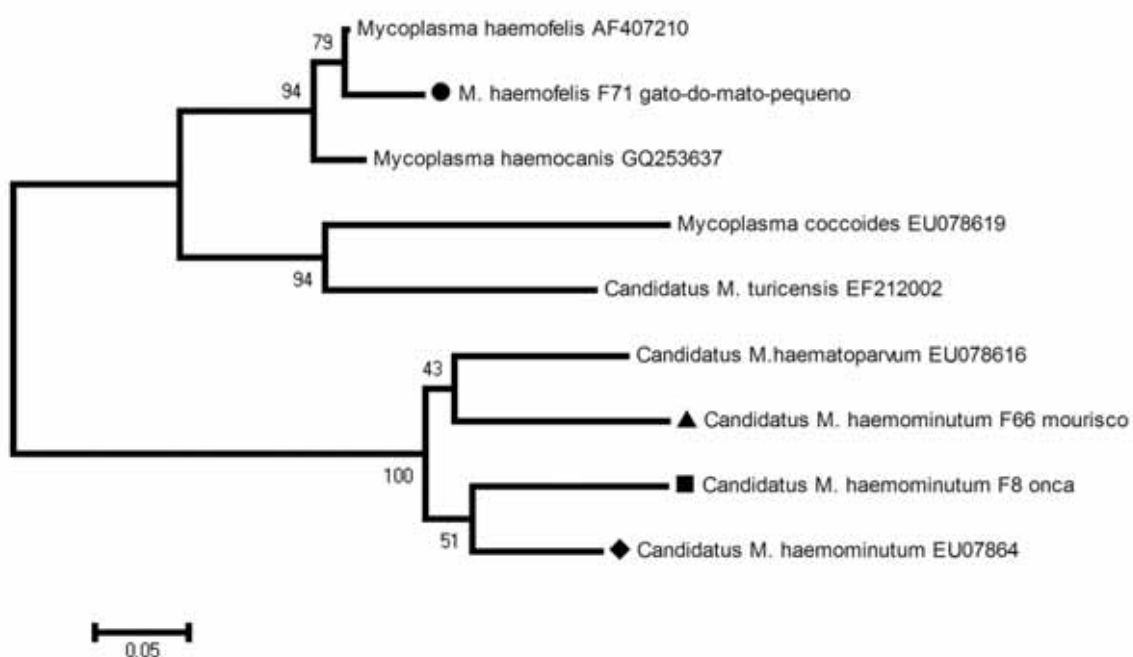
**Figura 23.** Posição filogenética de isolados de *Ehrlichia* spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de seqüências de DNA do gene *dsb* (409pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das seqüências encontram-se entre parênteses.



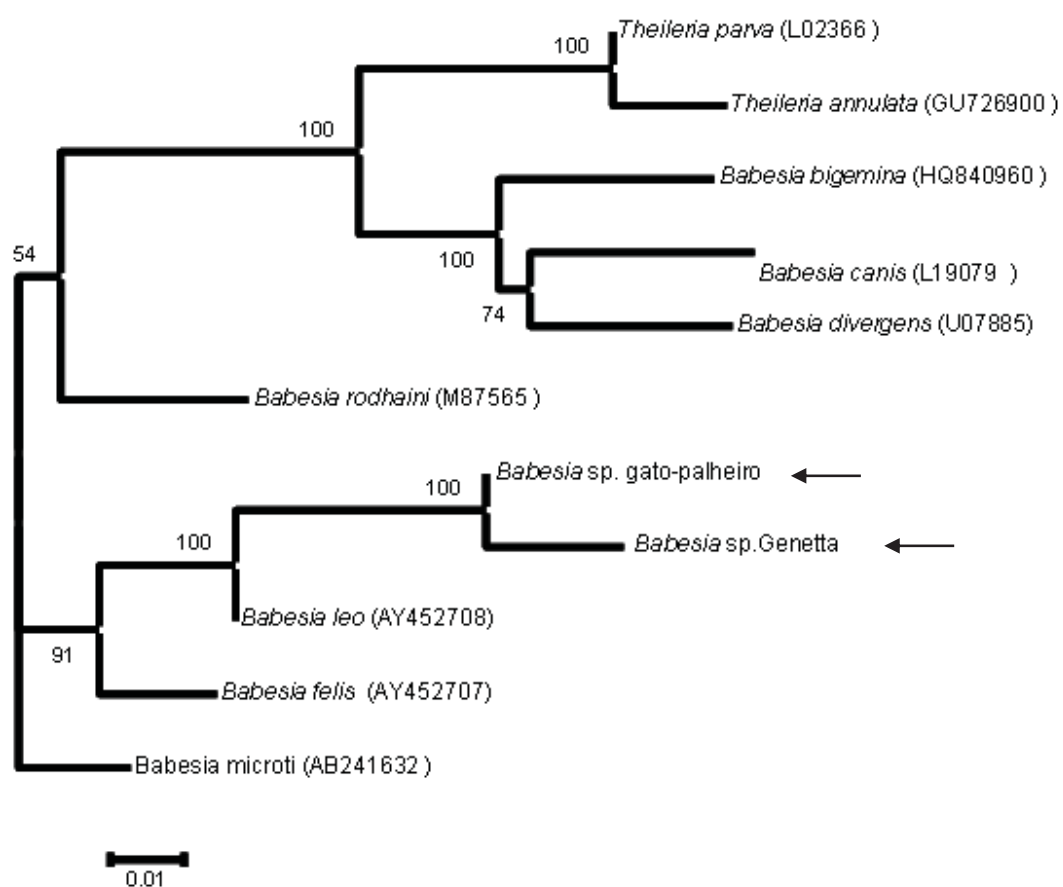
**Figura 24.** Posição filogenética de isolados de *Ehrlichia* spp. de canídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene *groESL* (1297pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências encontram-se entre parênteses.



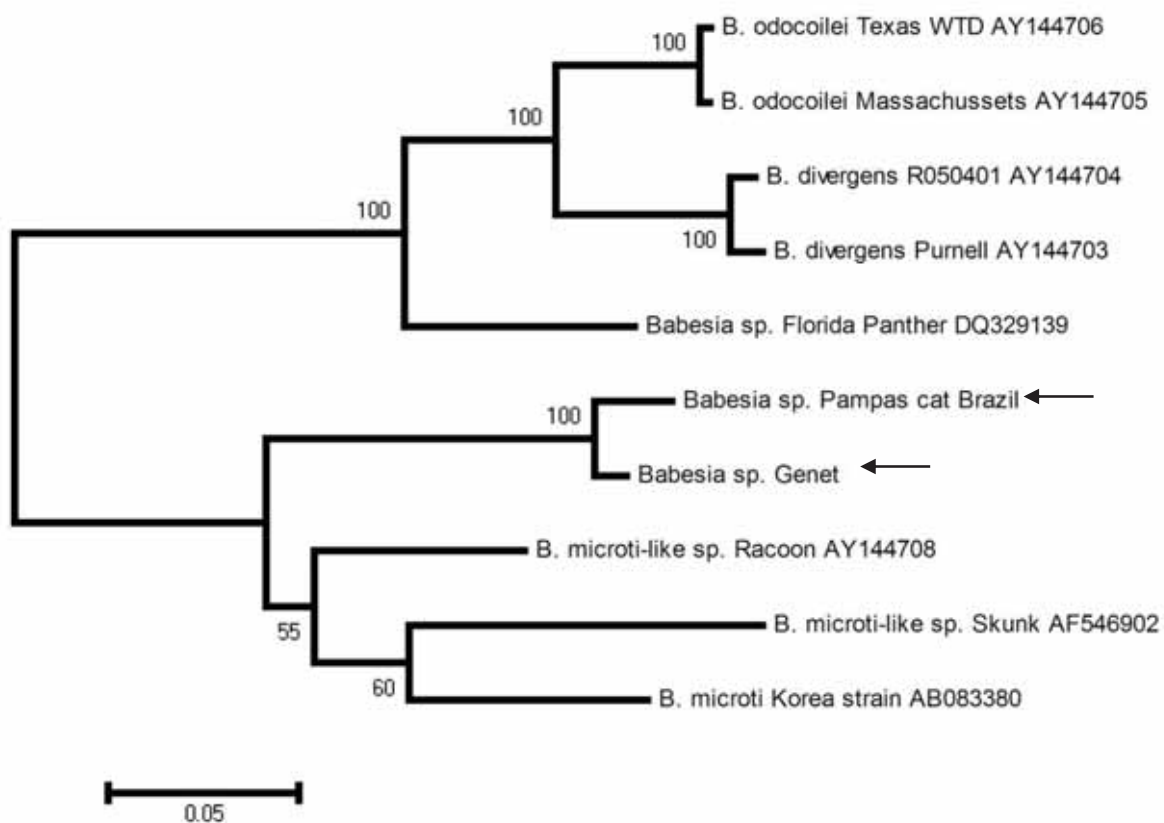
**Figura 25.** Posição filogenética de isolados de *Mycoplasma* spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de seqüências de DNA do gene *16S rRNA*(1475pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das seqüências estão indicados.



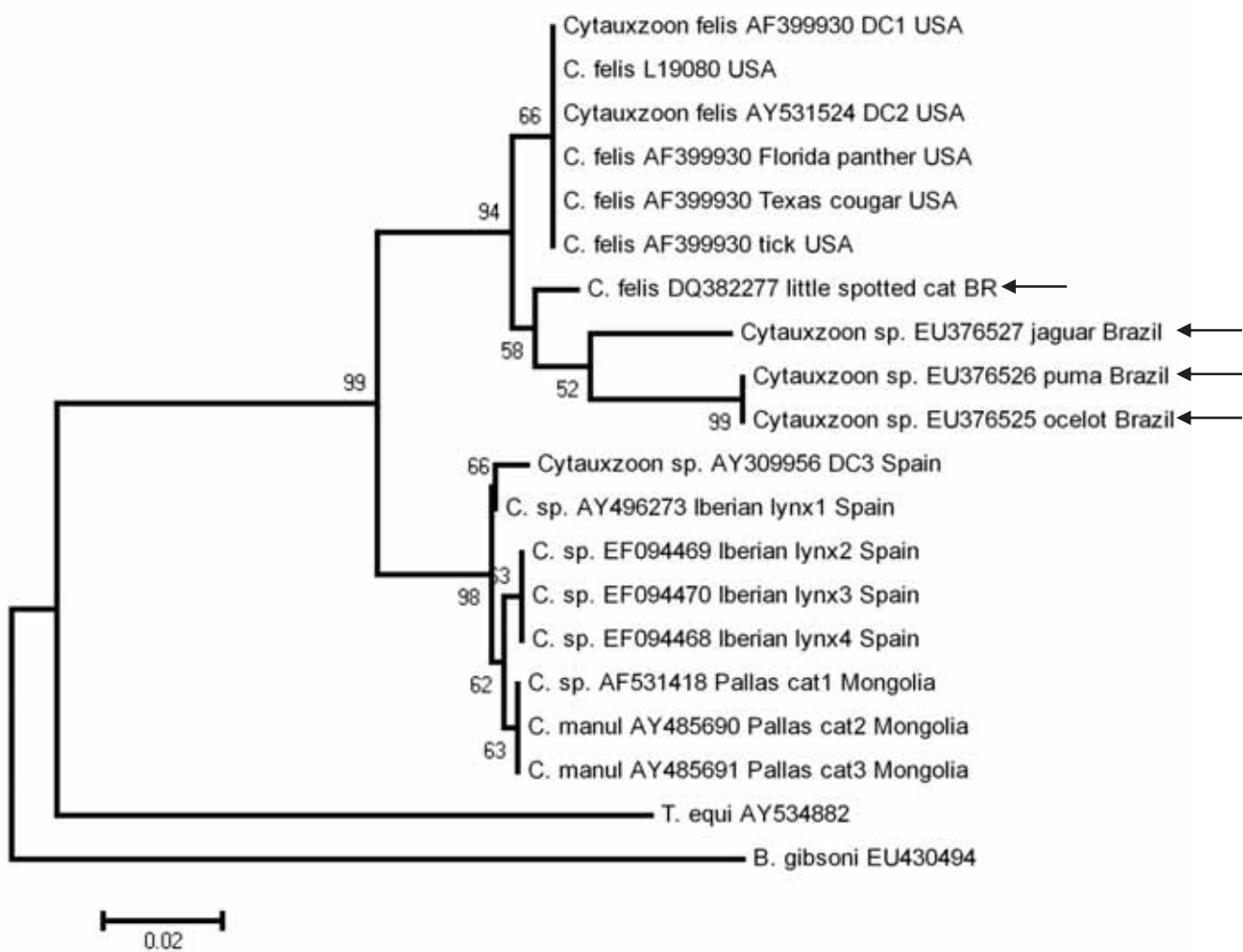
**Figura 26.** Posição filogenética de isolados de *Mycoplasma* spp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene *mpB* (200pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap. Os números de acesso das sequências estão indicados.



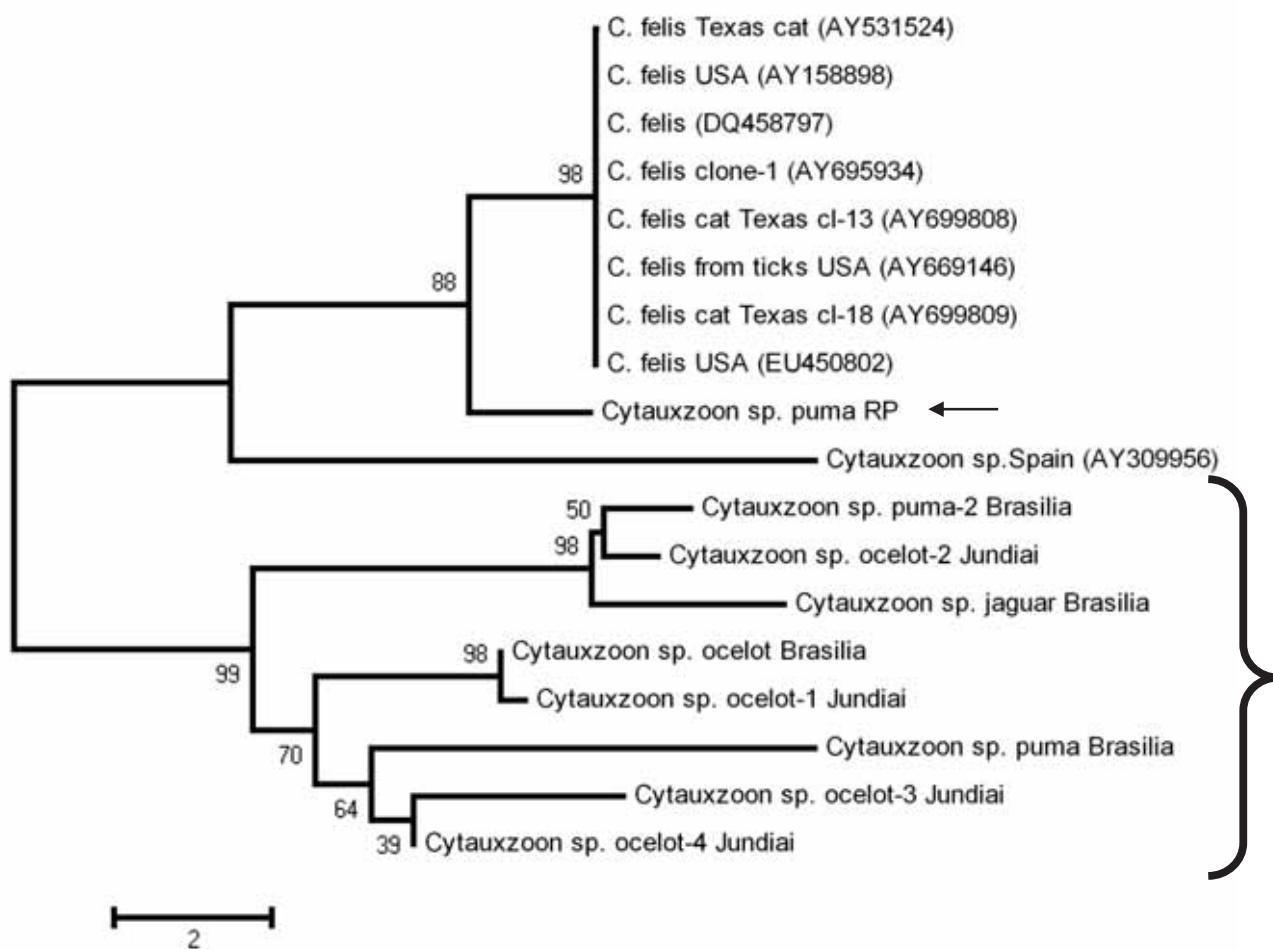
**Figura 27.** Posição filogenética de isolados de *Babesia* sp. de um gato-palheiro e uma geneta baseada na análise de sequências de DNA do gene 18SrRNA (900pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.



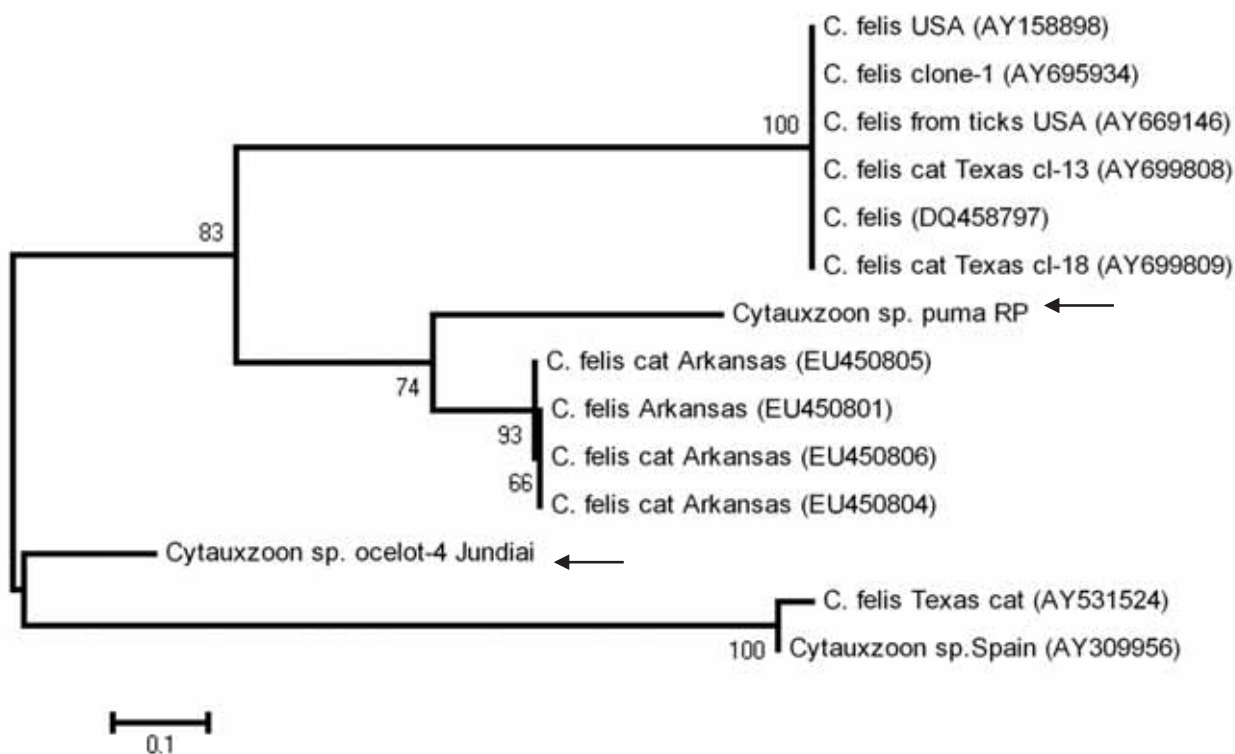
**Figura 28.** Posição filogenética de isolados de *Babesia* sp. de um gato-palheiro e uma geneta baseada na análise de seqüências de DNA do gene da  $\beta$ -*tubulina* (1198 pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.



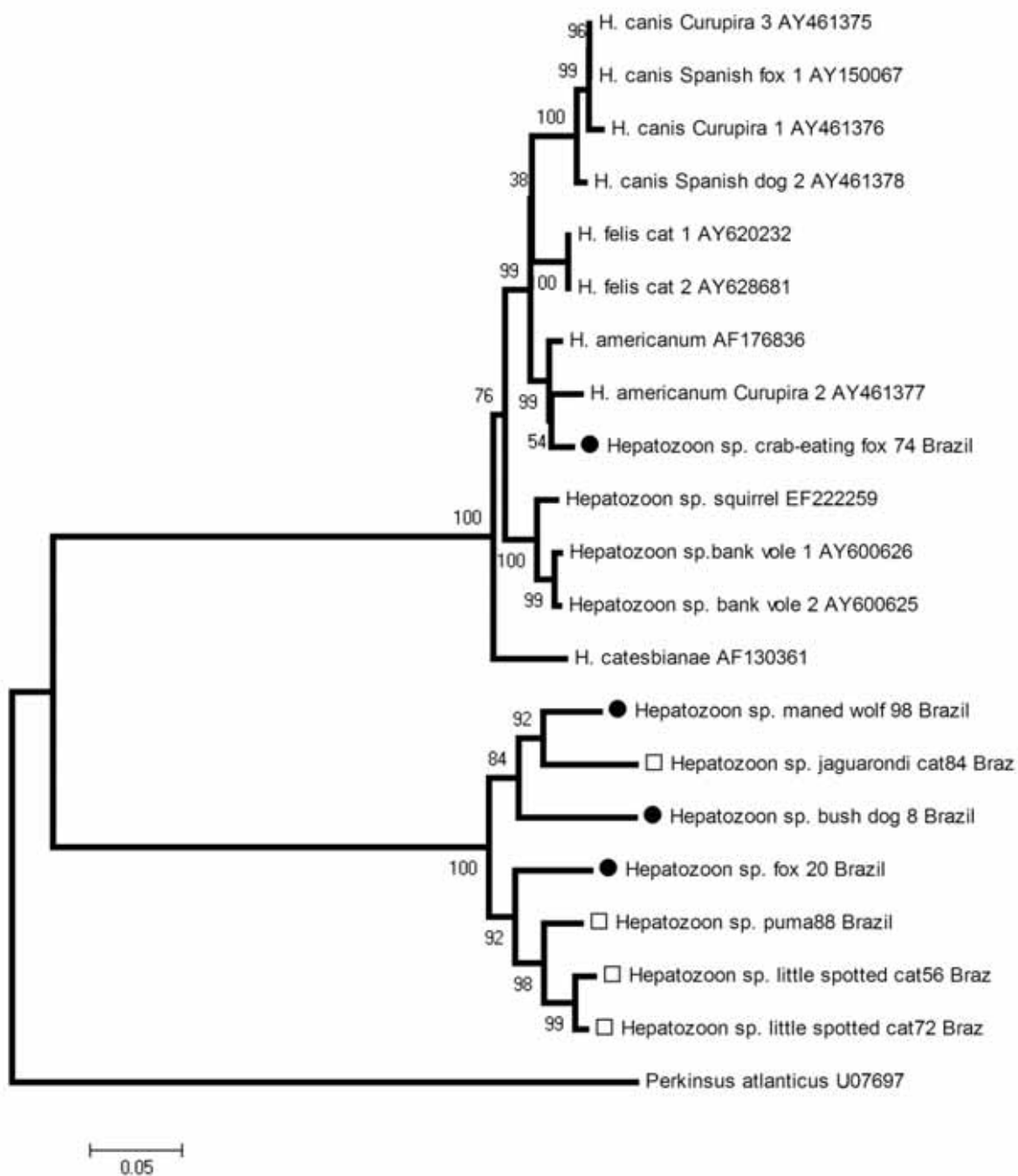
**Figura 29.** Posição filogenética de isolados de *Cytauxzoon* sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene 18SrRNA (651pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.



**Figura 30.** Posição filogenética de isolados de *Cytauxzoon* sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do região de espaçamento intergênica 1 (ITS-1) (431pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.



**Figura 31.** Posição filogenética de isolados de *Cytauxzoon* sp. de felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do região de espaçamento intergênica 2 (ITS-2) (800pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.



**Figura 32.** Posição filogenética de isolados de *Hepatozoon* spp. de canídeos e felídeos selvagens baseada na análise de sequências de DNA do gene 18SrRNA (1750pb). Os números em cada ramificação da árvore representam o valor de bootstrap.

### 5.16. Detecção de anticorpos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e do antígeno p27 de FeLV (vírus da leucemia felina)

Sete animais apresentaram-se soropositivos frente ao antígeno do vírus da imunodeficiência felina (FIV): 3 leões do Zoológico de Bauru, 1 jaguatirica do Zoológico de Itatiba, 1 leão do Zoológico de Ribeirão Preto e 2 leões do Zoológico de Sorocaba. Dois felídeos mostraram-se soropositivos para FIV e positivos na PCR para *Ehrlichia* sp.; um felídeo mostrou-se soropositivo para FIV e positivo na PCR para *Anaplasma* sp. Anticorpos anti-FIV foram detectados em um felídeo positivo na PCR para *Cytauxzoon* sp.

### 5.17. Co-positividade na PCR

A presença de co-infecção por mais de um hemoparasita foi verificada nas amostras de sangue dos carnívoros selvagens amostrados (**Tabela 16**).

**Tabela 16.** Co-infecção por hemoparasitas nas amostras de sangue de carnívoros selvagens mantidos em cativeiro.

Agentes	Número de felídeos selvagens	Número de canídeos selvagens
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Anaplasma</i> spp.	5	3
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> spp.	2	1
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Cytauxzoon</i> sp.	3	-
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Candidatus</i> M. haemominutum	3	-
<i>Anaplasma</i> spp. + <i>Candidatus</i> M. haemominutum	3	-
<i>Anaplasma</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> spp.	-	1
<i>Anaplasma</i> spp. + <i>Cytauxzoon</i> sp.	1	-
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Candidatus</i> M. haemominutum	1	-
<i>Cytauxzoon</i> sp. + <i>Candidatus</i> M. haemominutum	6	-

## VI. DISCUSSÃO

Recentemente, diversos estudos têm sido realizados para investigar o possível papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças transmitidas por artrópodes vetores, os quais ajudariam na determinação de áreas de risco para possível infecção humana e animais domésticos. Pouco se sabe a respeito da epidemiologia destas enfermidades em carnívoros selvagens, os quais poderiam atuar como boas sentinelas para estes agentes, já que além de serem hospedeiros para os hemoparasitas e para os carrapatos vetores, possuem uma maior área de abrangência do que outros hospedeiros de carrapatos. Enquanto que estudos de patogenicidade e tratamento destas enfermidades têm sido explorados intensivamente, a epidemiologia se mantém, em muitas regiões, especulativa. Os possíveis hospedeiros para os agentes causadores das enfermidades e os ciclos naturais de transmissão ainda não foram totalmente estabelecidos. A identificação de reservatórios selvagens para doenças transmitidas por artrópodes vetores poderia ajudar na elaboração de medidas profiláticas a fim de reduzir a exposição do homem, animais domésticos e outros animais selvagens a estes agentes.

No presente estudo, não foram observadas mórulas características de *Ehrlichia* sp. ou *Anaplasma* sp. em leucócitos nos esfregaços sangüíneos a partir de sangue de ponta de orelha dos animais estudados. Tais estruturas devem ser diferenciadas de estruturas intra e extracelulares semelhantes a elas, a fim de evitar diagnósticos falso-positivos, tais como plaquetas, material nuclear fagocitado em monócitos, grânulos azurófilos em linfócitos e corpos linfoglandulares (MYLONAKIS et al., 2003; DAGNONE et al., 2009). Mórulas características de *Ehrlichia* sp. em monócitos sangüíneos foram detectadas em uma leoa na África (BUORO et al., 1994).

O presente trabalho descreve a ocorrência de agentes Anaplasmataceae em carnívoros selvagens no Brasil. Embora levantamentos sorológicos tenham detectado anticorpos contra estes agentes em canídeos (ALEXANDER et al., 1994; PUSTERLA et al., 1999; WANER et al., 1999; PUSTERLA et al., 2000; SHAMIR et al., 2001; GROEN et al., 2002; SRÉTER et al., 2004) e felídeos selvagens (RYSER-DIGEORGIS et al.,

2005; FILONI et al., 2006; WIDMER et al., 2011) ao redor do mundo, poucos estudos vêm sendo conduzidos no que diz respeito à caracterização molecular destes patógenos em carnívoros selvagens.

Embora 28 carnívoros selvagens apresentaram produto amplificável com identidade de 98-99% para *E. canis* e 16 carnívoros apresentaram produto amplificável com identidade de 98% para *E. chaffeensis* pelo BLAST, a análise filogenética baseada no gene *16S rRNA* não permitiu a diferenciação das espécies de *Ehrlichia* spp. encontradas nos carnívoros selvagens amostrados no presente estudo. Apesar da identidade de 97% com *E. canis* pelo BLAST, a análise filogenética baseada no gene *omp-1* posicionou a *Ehrlichia* sp. encontrada em quatro felídeos selvagens em um ramo distinto daquele de *E. canis* (ANDRÉ et al., 2010a). Por outro lado, a análise filogenética baseada no gene *dsb* posicionou o DNA de *Ehrlichia* sp. encontrado em um cachorro-mato no mesmo ramo que *E. canis* - com alto bootstrap: 100/100 - confirmando assim a ocorrência desta espécie de *Ehrlichia* sp. nesta espécie animal. Ademais, as amostras anteriormente positivas na nested PCR para o gene *16S rRNA* não apresentaram produto amplificável em uma PCR em tempo real específica para *E. chaffeensis* (baseada no gene *vlp1*), confirmando-se não se tratar desta espécie. Recentemente, com base na análise filogenética baseada nos genes *16S rRNA* e *dsb*, duas onças-pintadas do Pantanal mato-grossense mostraram produto amplificado de *Ehrlichia* sp. agrupado em um cluster, embora distante, com diferentes isolados de *E. ruminantium*. Estes achados sugerem a existência de pelo menos duas variantes de *Ehrlichia* sp. infectando felídeos selvagens no Brasil. Em relação aos canídeos selvagens, *E. chaffeensis* já foi detectada em coyotes (*Canis latrans*) no estado de Oklahoma, EUA (KOCAN et al., 2000b). No Kênia, *E. canis* foi isolada de chacais (*Canis mesomelas*) por meio de cultivo celular (PRICE e KARSTAD, 1980).

DNA de *Anaplasma* spp. foi encontrado em amostras de sangue de quatro gatos-do-mato-pequeno e em um cachorro-vinagre. Na análise filogenética baseada no gene *16S rRNA*, o DNA de *Anaplasma* sp. encontrado em felídeos selvagens encontrou-se no mesmo ramo que *A. phagocytophilum* com alto bootstrap (975/1000; 97-99% de identidade com *A. phagocytophilum* pelo BLAST). Já na análise filogenética baseada no gene *groESL* (99% de identidade com *A. phagocytophilum* pelo BLAST), o DNA de

*Anaplasma* sp. encontrado em um canídeo selvagem foi posicionado no mesmo ramo que *A. phagocytophilum* e *A. bovis*. Resultados negativos foram encontrados quando as mesmas amostras foram submetidas a uma PCR em tempo real específica para *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*), suportando a hipótese de tratar-se de outra espécie de *Anaplasma* sp. parasitando canídeos e felídeos selvagens no Brasil. Nos EUA, *A. phagocytophilum* foi detectado em pumas (FOLEY et al., 1999) e coiotes (PUSTERLA et al., 2000) no estado da Califórnia. Os resultados do presente estudo, associados à recente detecção molecular de *Anaplasma* sp. filogeneticamente próximo à *A. platys* em cervídeos brasileiros (SACCHI, 2009) e à verificação de diferentes genótipos de *A. phagocytophilum* circulando em roedores, esquilos, eqüinos e lagartos nos Estados Unidos (REJMANEK et al., 2011) reforçam a necessidade de estudos de variabilidade genética e do possível risco para animais domésticos e humanos entre os isolados pertencentes ao genogrupo do *A. phagocytophilum*.

O real impacto da infecção por agentes Anaplasmataceae sobre a sobrevivência de carnívoros selvagens é ainda desconhecido. Inclusões intracitoplasmáticas similares a mórulas de *Ehrlichia* sp. foram encontradas em monócitos e células mononucleares de uma leoa exibindo sinais clínicos compatíveis com erliquiose (BUORO et al., 1994). Canídeos selvagens (*Lycaon pictus*) experimentalmente infectados com *E. canis* mostraram sinais clínicos característicos da erliquiose canina (VAN HEERDEN et al., 1979). Em nosso estudo, todos os animais amostrados eram clinicamente assintomáticos. Assim, carnívoros selvagens poderiam atuar como reservatórios para estes agentes no Brasil. Nos EUA, coiotes e raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) são considerados reservatórios potenciais para *E. chaffeensis* (DAVIDSON et al., 1999; KOCAN et al., 2000b).

Embora pulgas tenham sido observadas parasitando alguns animais amostrados, carrapatos não o foram. A via de transmissão destes agentes Anaplasmataceae necessita ainda ser determinada. Recentemente, DNA de *Ehrlichia* sp. foi encontrado em carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma triste* coletados de onças-pintadas do Pantanal mato-grossense parasitados com *Ehrlichia* sp., sugerindo o possível papel destas espécies de artrópodes na transmissão de agentes Anaplasmataceae entre os animais selvagens no Brasil (WIDMER et al., 2011).

Outro objetivo do presente estudo foi desenvolver uma PCR multiplex em tempo real baseada no sistema de sonda de hidrólise TaqMan para o diagnóstico genérico das infecções causadas por *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Bartonella* sp. Um teste de diagnóstico molecular genérico seria útil em levantamentos epidemiológicos e clínicos, no que diz respeito à avaliação de organismos vertebrados e invertebrados como hospedeiros, reservatórios e vetores de agentes transmitidos por artrópodes vetores, promovendo uma ferramenta de diagnóstico rápida e eficiente para a adoção de medidas de tratamento precoce das enfermidades ocasionadas pelos agentes sob estudo. Enfermidades transmitidas por carrapatos apresentam manifestações clínicas semelhantes entre si e com outras doenças virais, o que faz com que um rápido tratamento seja crucial para a recuperação do paciente. Ainda, agentes das famílias Anaplasmataceae e Bartonellaceae respondem ao mesmo tratamento, enfatizando a utilidade de uma multiplex genérica para estes agentes na rotina clínica. Em relação aos agentes Anaplasmataceae, dificuldades no cultivo in-vitro de espécies pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, reações cruzadas entre espécies desta família e com *Bartonella* sp., a ausência de anticorpos detectáveis na fase inicial da infecção, e a emergência de novas espécies zoonóticas transmitidas por artrópodes enfatiza a busca por ferramentas moleculares de diagnóstico simples, rápido e genérico de uso tanto em medicina humana quanto veterinária.

Embora o gene *16S rRNA* seja o alvo mais frequentemente utilizado na detecção molecular de agentes Anaplasmataceae, o gene “padrão-ouro” para uma ferramenta diagnóstica ainda não foi estabelecido (DOYLE et al., 2005). No presente estudo, utilizamos o gene *groESL* como alvo para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise para que, com isso, conseguíssemos diferenciar os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* de outros grupos filogeneticamente relacionados (*Neorickettsia* sp., *Rickettsia* sp., *Bartonella* sp., *Orientia* sp). Tentativas de uso de outros genes (*16S rRNA*, *gltA*, *ftsZ*, *rpoB*, *dsb*) mostraram-se infrutíferas devido aos critérios de exclusão para desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise ou a ausência de especificidade dos mesmos. Doyle et al. (2005) desenvolveram uma PCR em tempo real baseada no gene *dsb* empregando o sistema TaqMan, porém específica para as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*. Ainda, Sirigireddy et al. (2005)

desenvolveram um método de captura magnética para purificação do gene 16S rRNA com posterior detecção molecular específica para as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* por meio de uma PCR em tempo real utilizando a transcriptase reversa. Enquanto as duas PCRs em tempo real acima descritas objetivaram a detecção específica de agentes Anaplasmataceae, o presente estudo objetivou a detecção e separação genérica das espécies.

A decisão por incluir o gênero *Bartonella* sp. na PCR multiplex padronizada adveio principalmente da frequente reação cruzada observada em protocolos já padronizados da PCR para *Ehrlichia* sp. baseados no gene 16S rRNA. Ainda, poucos estudos vêm sendo conduzidos a respeito da epidemiologia da bartonelose no Brasil; desta forma, a PCR multiplex aqui desenvolvida poderá ser útil na busca de possíveis hospedeiros, reservatórios e vetores destes agentes no Brasil. Embora o cultivo seja considerado o método de diagnóstico ideal para infecções por *Bartonella* sp., a dificuldade e consumo de tempo resultante torna o cultivo uma ferramenta nada prática para uso em larga escala (COLBORN et al., 2010). Neste aspecto, testes moleculares baseados na PCR em tempo real para o diagnóstico de infecções por espécies de *Bartonella* sp. vem sendo desenvolvidos (MOLIA et al., 2004; MORICK et al., 2009; CIERVO et al., 2004; COLBORN et al., 2010). No presente estudo, diversos oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (baseados nos genes *nuoG*, *gltA*, *16SrRNA*) foram utilizados para amplificar o DNA de 11 diferentes espécies de *Bartonella* sp., escolhidas segundo critério de distância filogenética. O gene *nuoG* mostrou-se específico para a detecção de DNA de *Bartonella* sp. Recentemente, Colborn et al. (2010) verificaram a performance superior do gene *nuoG* como gene-alvo em uma PCR em tempo real quando comparado aos genes *ftsZ* e *gltA* para detecção molecular de *Bartonella* sp. Enquanto a discriminação específica do DNA de *Bartonella* sp. não tenha sido o objetivo de nosso estudo, trabalhos prévios foram conduzidos a fim de se realizar o diagnóstico específico de *Bartonella* sp. por meio de sistemas de amplificação baseados em curvas de “High Resolution Melt” (HRM) (MORICK et al., 2009) ou por meio da análise de mutações em um região interna do gene citrato sintase utilizando hibridização direta de LCRed e probes fluorescentes em associação à análise

da curva de dissociação, fazendo uso da tecnologia de transferência de energia por fluorescência e ressonância (CIERVO et al., 2004).

Uma PCR de amplo espectro traria como vantagem a detecção de novas amostras e espécies, o que é de grande importância em estudos epidemiológicos. Prakash et al (2009) desenvolveram uma PCR de amplo espectro para agentes causadores de riquettsioses do Grupo da Febre Maculosa, do Grupo do Tifo Murino e para *Orientia tsutsugamushi*. Este teste poderia ser usado em associação com o teste desenvolvido no presente estudo, para exame de triagem de populações, economizando tempo e gastos. Nosso teste poderá ser utilizado em futuros estudos clínicos e epidemiológicos, diferenciando os agentes transmitidos por artrópodes vetores nos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Bartonella* e, distinguindo-os de agentes filogeneticamente relacionados pertencentes aos gêneros *Neorickettsia*, *Rickettsia* e *Orientia*. Porém, a validação de nosso teste deverá ainda ser conduzida utilizando-se amostras clínicas de pacientes humanos, animais domésticos e selvagens e espécimes de artrópodes (carrapatos, pulgas, moscas, ácaros, etc), comparando os resultados com aqueles encontrados na Reação de Imunofluorescência Indireta e PCR convencional.

O ganho em especificidade obtido com os oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise para o gene *groESL* (gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*) e para o gene *nuoG* (gênero *Bartonella*) resultou em uma perda de sensibilidade na PCR desenvolvida. Assim, enquanto o limite de detecção da reação de amplificação para o gênero *Anaplasma* foi de  $2,0 \times 10^1$  cópias/ $\mu\text{L}$ , limites de detecção de  $2,0 \times 10^2$  cópias/ $\mu\text{L}$  e  $2,0 \times 10^3$  cópias/ $\mu\text{L}$  foram obtidos para a amplificação de DNA de espécies dos gêneros *Ehrlichia* e *Bartonella*, respectivamente. Neste aspecto, 17 felídeos e 10 canídeos selvagens mostraram-se positivos para *Anaplasma* sp., mostrando a superior sensibilidade da PCR em tempo real aqui desenvolvida sobre os protocolos padrões de nested PCR empregados em nosso estudo. Em contrapartida, apenas um felídeo selvagem mostrou-se positivo na PCR para *Ehrlichia* sp., demonstrando a sensibilidade inferior da PCR em tempo real para estes agentes quando comparada à nested PCR utilizando protocolos descritos na literatura. Porém, é válido mencionar que o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise para os três gêneros em

questão foram desenhados com base em sequências de espécies já definidas e depositadas no GenBank. Com base na análise filogenética de diversos genes realizada em nosso estudo e na PCR em tempo real específica para *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*), verificou-se que provavelmente os agentes Anaplasmataceae encontrados nos felídeos e canídeos selvagens amostrados tratam-se de amostras com diferenças genéticas ou até novas espécies. Assim, a despeito da sensibilidade, os oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise aqui desenhados para amplificar o gênero *Ehrlichia*, possivelmente não foram capazes de abranger estas novas amostras ou espécies encontradas nos animais selvagens aqui amostrados. Em relação à amplificação do DNA de *Bartonella* sp., nenhum animal amostrado mostrou-se positivo para o gênero em questão, possivelmente em decorrência da baixa sensibilidade observada. Porém, neste caso, os resultados obtidos na PCR em tempo real para *Bartonella* sp. foram reproduzidos quando as mesmas amostras foram processadas com protocolos convencionais de PCR descritos na literatura (dados não mostrados). Neste caso, a baixa bacteremia verificada nas amostras de sangue dos carnívoros selvagens amostrados pode ser responsável pelos resultados negativos na PCR convencional e em tempo real. O pré-enriquecimento em meios de cultura seguido da extração de DNA e PCR aumenta a sensibilidade de detecção de *Bartonella* sp. em amostras de sangue (BREITSCHWERDT et al., 2010). A sensibilidade e eficiência da técnica não foram alteradas quando reações do tipo “singleplex” foram processadas em uma PCR do tipo multiplex, demonstrando a possibilidade de economizar tempo na detecção simultânea de agentes pertencentes aos três gêneros em questão. Assim, futuros estudos devem ser conduzidos com amostras de animais sabidamente positivos para agentes Anaplasmataceae e *Bartonella* sp. para a validação da técnica.

Em relação à prevalência de micoplasmas hemotróficos entre os carnívoros selvagens amostrados, o presente estudo encontrou uma porcentagem de positividade de 13,2% para *Candidatus* M. haemominutum e 0,6% para *M. haemofelis* dentre os felídeos selvagens amostrados, e de 2% para *Candidatus* M. haemominutum e *Candidatus* M. haematoparvum entre os canídeos selvagens amostrados.

Em estudos anteriores, DNA de *M. haemofelis* foi detectado em dois tigres em um zoológico nos Estados Unidos (HAEFNER et al., 2003). Já no Brasil, DNA de *Candidatus M. haemominutum* foi detectado em um leão mantido em cativeiro no zoológico de Curitiba, estado do Paraná, Brasil (GUIMARÃES et al., 2007). Por meio da técnica de PCR em tempo real, DNA de hemoplasmas foram detectados em lincos ibéricos (*Lynx pardinus*) na Espanha, lincos da Eurásia (*Lynx lynx*) na Suíça, gatos-selvagens europeus (*Felis silvestris silvestris*) na França, leões (*Panthera lion*) na Tanzânia, e suçuaranas, gatos-do-mato-pequeno, gatos-do-mato-grande, gatos-maracajá e jaguatiricas no Brasil (WILLI et al., 2007b).

Enquanto que, no presente estudo, nenhum felídeo mostrou-se positivo para *Candidatus M. turicensis*, o mesmo foi o hemoplasma mais frequentemente encontrado em gatos-selvagens (*Felis silvestris silvestris*) na França (WILLI et al., 2007b). No Brasil, este hemoplasma foi detectado em um gato-do-mato brasileiro em um estudo prévio (WILLI et al., 2007b) pela PCR em tempo real.

*Candidatus M. haemominutum* foi o hemoplasma mais frequentemente encontrado pelo nosso estudo e por um estudo anterior amostrando lincos ibéricos, lincos da Eurásia, leões africanos e felídeos neotropicais brasileiros (WILLI et al., 2007b). Interessantemente, na análise filogenética de um fragmento de 200 pb do gene *rnpB*, o DNA de um hemoplasma detectado em um gato-mourisco da Associação Mata Ciliar de Jundiá foi posicionado no mesmo ramo que *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Sabendo-se que *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* são agentes filogeneticamente muito próximos, futuros estudos devem ser conduzidos a fim de se obter uma melhor diferenciação molecular entre estes organismos, com base na análise filogenética de um fragmento maior de outros genes-alvo.

Um hemoplasma filogeneticamente próximo ao *Candidatus M. haemominutum* (98% de identidade com base em um fragmento do gene *16S rRNA*) foi detectado em dois lobos europeus amostrados no presente estudo. Este hemoplasma felino foi também detectado em cães domésticos na China (ZHUANG et al., 2009), no Brasil (BIONDO et al., 2009) e no Japão (OBARA et al., 2011). A detecção de DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (hemoplasma que infecta preferencialmente

felídeos) em canídeos no presente estudo, juntamente com a detecção de *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (um hemoplasma que infecta preferencialmente canídeos) em um gato-mourisco aqui amostrado, sugere que estes dois hemoplasmas filogeneticamente relacionados circulem entre canídeos e felídeos de uma maneira não tão específica.

Ainda em relação aos canídeos selvagens, *Candidatus M. haematoparvum* foi detectado em dois cachorros-vinagre do presente estudo. Poucos estudos têm sido conduzidos a respeito da prevalência de hemoplasmas em canídeos domésticos e selvagens. *Candidatus M. haematoparvum* e *M. haemocanis* foram detectados em cães domésticos da América do Norte e Europa (KENNY et al., 2004; SYKES et al., 2005; WENGI et al., 2008; NOVACCO et al., 2009). Nosso trabalho representa a primeira detecção molecular de micoplasmas hemotróficos em canídeos selvagens (ANDRÉ et al., 2011a). No Brasil, *Mycoplasma* sp. foi detectado em esfregaços sanguíneos de cães domésticos em Belo Horizonte, Minas Gerais (O'DWYER et al., 1997). Ainda, *M. haemocanis* foi detectado em um cão (0,49%) da cidade de Recife, Pernambuco, por meio de técnicas moleculares (RAMOS et al., 2010).

A prevalência de infecção por hemoplasmas em felídeos selvagens mantidos em cativeiro encontrada no presente estudo foi menor que aquela encontrada em felídeos selvagens de vida livre (WILLI et al., 2007b). Tal fato pode ser explicado pela maior exposição a artrópodes hematófagos que felídeos selvagens de vida livre são submetidos, uma vez que animais mantidos em cativeiro (como em zoológicos) são submetidos a tratamentos com acaricidas com certa frequência. Desta forma, animais em cativeiro são menos expostos a hemoparasitas quando comparados àqueles de vida livre (WILLI et al., 2007b).

Embora exames clínicos e hematológicos acurados não tenham sido realizados no momento de colheita das amostras, os animais positivos na PCR para hemoplasmas eram aparentemente saudáveis. Tal fato pode se dever à baixa patogenicidade dos patógenos em questão. Sinais clínicos característicos de hemoplasmose não foram ainda reportados em carnívoros selvagens. Neste aspecto, foram relatadas a presença de palidez de membranas mucosas e anemia não-regenerativa em um lince ibérico de vida livre co-infectado com *Candidatus M. turicensis* e *Cytauxzoon felis* (WILLI et al.,

2007b). Willi et al. (2007b) não observaram alterações significativas nos valores de hematócrito de felídeos selvagens naturalmente infectados com hemoplasmas, quando comparados àqueles negativos na PCR para os mesmos agentes. Adicionalmente, a ocorrência da doença pode ser subdiagnosticada ou essas espécies animais são mais resistentes a estes hemoparasitas que cães e gatos domésticos. Entretanto, a imunossupressão causada por fatores estressantes (tais como translocação e manutenção em cativeiro), doenças intercorrentes ou tratamento com corticosteróides podem induzir uma bacteremia por hemoplasmas e, como consequência, anemia (GUIMARÃES et al., 2007). Embora se tenha verificado uma associação entre hemoplasmas e retrovírus imunossupressores (FIV e FeLV) em gatos domésticos (HORA, 2008; MACIEIRA et al., 2008), nenhum felídeo positivo para *Mycoplasma* spp. apresentou anticorpos para FIV ou antígeno de FeLV no presente estudo. Willi et al. (2007b) verificaram uma maior ocorrência de micoplasmas hemotróficos em gatos-selvagens europeus (*Felis silvestris silvestris*) positivos para FeLV quando comparado àqueles negativos para o retrovírus em questão. Outra explicação plausível para a ausência de sinais clínicos observada nos carnívoros selvagens positivos na PCR para hemoplasmas em nosso estudo seria que estes animais poderiam estar em um estado de carreadores crônicos da infecção no momento de colheita das amostras, ao invés de estarem na fase aguda da doença. Desta forma, futuros estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar o potencial patogênico destes hemoplasmas para canídeos e felídeos selvagens.

A via de transmissão dos hemoplasmas reportados no presente estudo permanece desconhecida. Artrópodes hematófagos (carrapatos e pulgas) são os vetores incriminados na transmissão de micoplasmas hemotróficos para felinos domésticos (SHAW et al., 2004; LAPPIN et al., 2006). Entretanto, tentativas de infecção experimental de gatos com hemoplasmas via pulgas mostraram-se inconclusivas (WOODS et al., 2005). Ingestão de pulgas *Ctenocephalides felis* (ou de seus bio-produtos, tais como fezes, ovos ou larvas) infectadas com *M. haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum* mostraram-se ineficazes na transmissão destas espécies de hemoplasmas (WOODS et al., 2006). Uma vez que pulgas foram encontradas parasitando alguns animais amostrados e, ainda, considerando que a infestação por

pulgas seja comum em zoológicos do Estado de São Paulo (ADANIA et al., 1998), é possível que estes insetos estejam envolvidos na transmissão destes hemoplasmas. A suspeita de carrapatos como vetores de hemoplasmas tem se baseado no fato de que o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é considerado o principal vetor para *M. haemocanis* entre cães (SENEVIRATNA et al., 1973). Ainda, *Candidatus M. haemominutum* e *M. haemofelis* foram detectados em *R. sanguineus* coletados de leões na Tanzânia (FYUMAGWA et al., 2008). Por fim, a transmissão de micoplasmas hemotróficos pelo contato social parece ser menos provável que aquela por interações agressivas (DEAN et al., 2008; MUSEUX et al., 2009).

Ainda, considerando o fato de que a ocorrência da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos e errantes no Brasil é um tanto quanto freqüente (HORA, 2008; BAUMANN et al., 2006; BATISTA, 2004; MACIEIRA et al., 2008), e que a presença de gatos errantes em zoológicos no Brasil é comum (ADANIA et al., 1998), estes animais podem atuar como adicional fonte de infecção para os carnívoros selvagens em zoológicos. No Brasil, a prevalência de hemoplasmas em gatos domésticos doentes e anêmicos varia de 2,2% a 38,0% para *M. haemofelis*, 4% a 13,5% para *Candidatus M. haemominutum*, e de 0,37% a 2,7% para *Candidatus M. turicensis* (HORA, 2008; BAUMANN et al., 2006; BATISTA, 2004; MACIEIRA et al., 2008).

Em relação a ocorrência de piroplasmas no Brasil, cães podem ser parasitados por *B. vogeli* e *B. gibsoni*, cujo vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (PASSOS et al., 2005; DANTAS-TORRES e FIGUEIREDO, 2006; TRAPP et al., 2006; FURUTA et al., 2009). Em canídeos selvagens, *B. rossi* foi detectada em cães selvagens (*Lycaon pictus*) na África (MATJILA et al., 2008). Ainda, *Theileria annae* e piroplasmas filogeneticamente próximos de *B. microti* foram detectados em cães selvagens (*Nyctereutes procyonoides*) na Coréia do Sul (HAN et al., 2010) e raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) no Canadá, respectivamente (CLANSEY et al., 2010). A presença de sororeatividade (10%) dos canídeos selvagens amostrados frente ao antígeno de *B. vogeli* pode representar uma exposição à *B. vogeli* ou a uma espécie de *Babesia* sp. filogeneticamente relacionada à mesma, porém ainda não identificada.

Embora estruturas semelhantes à piroplasmas em eritrócitos tenham sido encontradas em esfregaços sanguíneos de felinos domésticos no Brasil, a identificação

gênero e espécie-específica não foi realizada por meio de caracterização molecular (GAZETA et al., 2004; DANTAS-TORRES e FIGUEIREDO, 2006; MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2004). O presente estudo traz a primeira detecção e caracterização molecular de *Babesia* sp. em um gato-palheiro, um felídeo neotropical, e em uma geneta, um viverrídeo de origem africana (ANDRÉ et al., 2011b). Um piroplasma filogeneticamente relacionado à *Babesia* sp. isolada do carrapato *Ixodes ovatus* no Japão, *B. odocoilei* e *B. divergens* foi detectado em pumas (*Puma concolor coroyi*) na Flórida (YABSLEY et al., 2006). Ainda, *B. felis*, *B. leo* e uma espécie de *Babesia* sp. ainda não identificada foram encontrados em felídeos selvagens de vida-livre e cativeiro (chitas, leões, gatos selvagens, servals, leopardos, caracals) e felinos domésticos na África do Sul (PENZHORN et al., 2001; BOSMAN et al., 2006) por meio de métodos moleculares. O presente estudo traz a primeira detecção de um piroplasma filogeneticamente próximo à *B. leo* fora do continente africano (ANDRÉ et al., 2011b). A presença de soropositividade de felídeos selvagens amostrados frente ao antígeno de *B. vogeli* pode representar uma reação cruzada com *B. leo*, ou com uma subespécie de *B. canis* ainda a ser elucidada em felídeos selvagens. Neste aspecto, *B. canis presentii*, uma subespécie de *B. canis*, foi detectada em felinos domésticos nos Estados Unidos (BANETH et al., 2004). A ocorrência de 31% de soropositividade nos felídeos selvagens amostrados poderia indicar a presença de uma exposição prévia a algum piroplasma ou, ainda, representar um estado de carreador crônico no qual o número de parasitas está abaixo do limiar de detecção das técnicas moleculares empregadas no presente estudo. A babesiose felina tem sido reportada esporadicamente em vários países, mas não parece ser uma doença com significado clínico que ocorra regularmente quando comparada àqueles casos verificados na África do Sul (PENZHORN et al., 2004).

Carrapatos não foram encontrados parasitando os animais no momento da colheita das amostras e, dessa forma, o vetor desta espécie de *Babesia* sp. permanece desconhecido. Em um estudo filogenético, *B. felis* e *B. leo*, encontradas em felídeos selvagens africanos, foram agrupadas no mesmo ramo que *B. microti*, sugerindo que possuem o mesmo modo de transmissão transtadial por meio da picada de carrapatos (PENZHORN et al., 2001). Os fragmentos de DNA de *Babesia* sp. encontrados no gato-palheiro e na geneta no presente estudo foram agrupados no

mesmo ramo que *B. leo*, *B. felis* e *B. microti* pela análise filogenética do gene *18S rRNA*; ainda, baseado na análise filogenética do gene da  $\beta$ -tubulina, os fragmentos de DNA encontrados foram posicionados no mesmo ramo que *B. microti* (uma vez que sequências dos outros piroplasmas para este gene não estão ainda disponíveis no GenBank).

A despeito da elevada sensibilidade das técnicas utilizadas para detecção molecular (nested PCR) (JEFFERIES et al., 2008) e sorológica (RIFI) (FURUTA et al., 2009) para *Babesia* sp., podemos inferir que canídeos e felídeos selvagens em cativeiro nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil não são frequentemente expostos aos agentes da babesiose canina e felina. Embora a ocorrência de babesiose felina no Brasil em felinos domésticos não tenha sido ainda estudada, verifica-se uma alta prevalência de exposição à *B. vogeli* em cães da região sudeste do Brasil (FURUTA et al., 2009).

Muitas das espécies animais amostradas estão atualmente ameaçadas de extinção. Embora todos os animais amostrados fossem aparentemente saudáveis no momento de colheita das amostras, o real impacto que o parasitismo por uma espécie de *Babesia* sp. pode ocasionar na saúde e conservação destas espécies animais é ainda desconhecido. Quando animais selvagens são submetidos a situações estressantes, tais como captura e manutenção em cativeiro, uma babesiose clínica pode se manifestar (PENZHORN et al., 2006). Neste aspecto, pumas da Califórnia, quando transferidas para o Egito vieram a óbito devido a uma babesiose fatal causada por uma espécie não-identificada de *Babesia* sp. (CARPANO, 1934). Ainda, um canídeo selvagem africano (*Lycaon pictus*) infectado por *Babesia* sp., após mostrar sinais clínicos-laboratoriais compatíveis com babesiose, veio a óbito (COLLY e NESBIT, 1992). Por outro lado, coiotes (*Canis latrans*) podem atuar como reservatórios de *B. gibsoni*, uma vez que, quando experimentalmente infectados, apresentaram parasitemia de alto nível e longa duração, embora demonstrassem somente sinais clínicos moderados de babesiose (EVERS et al., 2003). Futuros estudos devem ser conduzidos a fim de investigar o potencial patogênico da *Babesia* sp. filogeneticamente relacionada à *B. leo* em felídeos selvagens no Brasil. Na África, leões parasitados por *B. leo* não manifestaram babesiose clínica, embora felinos domésticos quando infectados por este

piroplasma tornaram-se anêmicos (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999; PENZHORN, 2006). Possivelmente, o gato-palheiro e a geneta poderiam estar atuando como carreadores crônicos do parasita. Estudos adicionais devem ser conduzidos levando em consideração a morfologia, caracterização molecular, vetores envolvidos, reservatórios e o potencial patogênico de piroplasmas na fauna selvagem brasileira.

Ainda em relação à detecção molecular de piroplasmas, o presente estudo encontrou uma prevalência de 12,5% (21/167) para *Cytauxzoon* sp., um piroplasma filogeneticamente próximo à *Babesia* sp., pertencente à família Theileridae. Esta prevalência foi similar àquela reportada em lince na Espanha (MILLÁN et al., 2007). Também, Kocan e Blouin (1985) encontraram piroplasmas semelhantes aos de *C. felis* em cinco dentre uma amostra de 16 “bobcats” no estado de Oklahoma, EUA. Uma prevalência de infecção por *C. felis* de 39% e 35% foi encontrada entre “cougars”-do-Texas (*Puma concolor stanleyana*) e panteras-da-Flórida (*Puma concolor coroyi*), respectivamente, no estado da Flórida, EUA (ROTSTEIN et al., 1999).

No Brasil, Mendes-de-Almeida et al. (2007) encontraram piroplasmas semelhantes a *C. felis* em 59% de gatos errantes no Rio de Janeiro, porém sem confirmação molecular. A primeira confirmação da ocorrência de *C. felis* no Brasil foi realizada por Peixoto et al. (2007) em leões que vieram à óbito, diagnosticado pelo encontro de esquizontes característicos de *C. felis* em macrófagos associados à células endoteliais. Noss estudo traz a detecção molecular do parasita em jaguatiricas, suçuaranas, onças-pintadas, gatos-do-mato-pequenos, gatos-mourisco e tigres (ANDRÉ et al., 2009).

Embora uma avaliação clínica e hematológica acurada não tenha sido realizada nos felídeos amostrados, os mesmos eram aparentemente saudáveis no momento de colheita das amostras. Da mesma forma, a positividade na PCR para *C. felis* entre lince ibéricos não foi associada com a ocorrência de casos clínicos da enfermidade em um estudo prévio (MILLÁN et al., 2007). Felídeos selvagens no Brasil poderiam atuar como reservatórios do parasita, assim como “bobcats” (GLENN et al., 1982; BLOUIN et al., 1984; 1987) e panteras-da-Flórida (BUTT et al., 1991; ROTSTEIN et al., 1999) nos EUA. Futuros estudos devem ser conduzidos a fim de verificar se felídeos neotropicais apresentam, da mesma forma que “bobcats” (os principais reservatórios do protozoário

nos EUA), uma fase esquizogônica auto-limitante e de curta duração, o que conferiria aos mesmos a qualidade de reservatório. Se os animais foram encontrados como portadores do parasita (positivos na PCR) e não manifestaram sinais clínicos, possivelmente apresentaram uma fase esquizogônica (a qual é responsável pela manifestação clínica da enfermidade) de curta duração. Felinos domésticos nos EUA são outros possíveis reservatórios do parasita, uma vez que foram encontrados animais positivos na ausência de sinais clínicos ou que se recuperaram de uma *Cytauxzoonose* clínica (MEINKOTH et al., 2000; HABER et al., 2007). Assim, a idéia de que a *Cytauxzoonose* era uma doença terminal em gatos (HOSKINS, 1991), hoje não é mais aceita. No Brasil, até o momento, não existem relatos de detecção molecular de *C. felis* em felinos domésticos e, dessa forma, um teste sorológico com alta especificidade e sensibilidade seria desejável para que futuros estudos epidemiológicos possam ser desenvolvidos. O parasita, até o momento, não foi mantido em cultivo, o que dificulta ainda mais estudos de caracterização antigênica e molecular do mesmo. Interessantemente, oito animais naturalmente infectados com *C. felis* foram também soropositivos frente ao antígeno de *B. canis vogeli*, o que pode representar uma possível reação cruzada entre os piroplasmas em questão.

É válido ressaltar que a variabilidade genética de amostras do parasita de diferentes regiões geográficas possa ser responsável pela ausência de sinais clínicos nos animais amostrados. Embora a análise filogenética baseada no gene *18S rRNA* tenha posicionado os isolados brasileiros de *Cytauxzoon* sp. no mesmo ramo que isolados de *C. felis* da América do Norte (distinguindo-os do ramo de *Cytauxzoon manul*), a análise filogenética baseada nas regiões de espaçamento intergênicas (ITS-1 e ITS-2), as quais evoluem mais rapidamente ao longo do tempo, chama a atenção para a existência de uma variabilidade genética entre isolados de *C. felis* do Brasil e América do Norte, com a formação de dois ramos distintos. Brown et al. (2009a), ao analisarem a variabilidade genética de isolados de *C. felis* a partir de amostras de sangue de gatos dos estados da Geórgia e Arkansas, EUA, verificaram a existência de uma associação significativa entre sequências específicas da região de espaçamento interna de transcrição (ITS) e sobrevivência dos gatos infectados. Entretanto, tal associação não foi observada em estudos subseqüentes (BROWN et al., 2009b, 2010;

COHN et al., 2011). Uma possível associação entre genótipos de *C. felis* e localização geográfica foi observada por Brown et al. (2009a). Recentemente, isolados de *C. felis* de “bobcats” de 11 estados dos EUA mostraram grande variabilidade genética baseada nas regiões ITS-1 e ITS-2; entretanto, segundo os autores, tal variabilidade pode representar pouco valor no que diz respeito à virulência ou mesmo distribuição geográfica (SHOCK et al., 2011a). Desta forma, é possível que genótipos de *C. felis* apresentem variação não somente em relação a sua origem e capacidade de causar doença, mas também no que diz respeito à adaptação em diferentes carrapatos vetores (REICHARD et al., 2010). Atualmente, a análise de variabilidade genética de isolados de *Cytauxzoon* sp. das Américas do Sul e do Norte está sendo estudada em uma parceria do Laboratório de Imunoparasitologia (FCAV-Unesp) com pesquisadores da Universidade da Geórgia, EUA, lideradas pelo Prof. Dr. Michael Yabsley.

Considerando o fato que *C. felis* levou ao óbito leões no estado do Rio de Janeiro (PEIXOTO et al., 2007), a possibilidade da existência de diferentes variantes antigênicas no Brasil e, como consequência, a possibilidade de doença clínica nos felídeos selvagens brasileiros não pode ser descartada baseada somente nas informações obtidas no presente estudo. *Cytauxzoon felis* foi incriminado como agente causador da morte de “bobcats” (NIETFELD e POLOCK, 2002) e um tigre (GARNER et al., 1996) nos EUA. Riscos de doença podem existir no que diz respeito à translocação de animais entre zoológicos e entre felídeos selvagens e domésticos (MILLÁN et al., 2007).

Embora futuros estudos ainda devam ser conduzidos, pressupõe-se que o parasita seja transmitido por carrapatos no Brasil. É sabido que os carrapatos *Dermacentor variabilis* (BLOUIN et al., 1984) e *Amblyomma americanum* (REICHARD et al., 2010) são vetores competentes para *C. felis* nos EUA. Ainda que pulgas (*Ctenocephalides* sp.) tenham sido encontradas nos animais no momento da colheita das amostras, carrapatos não o foram.

No que diz respeito à ocorrência de *Hepatozoon* sp. nos animais amostrados no presente estudo, seis felídeos (3,6%) e cinco canídeos selvagens (5%) foram positivos para o agente em questão. A árvore filogenética construída com *Perkinsus marinus* como “outgroup” mostrou dois diferentes clusters: o primeiro deles composto por

espécies de *Hepatozoon* sp. previamente isoladas de carnívoros, roedores e vertebrados inferiores do Brasil, Estados Unidos e Europa; no segundo cluster foram agrupadas isolados de *Hepatozoon* sp. encontrados no presente estudo (exceto por um isolado de *Hepatozoon* sp. filogeneticamente próximo do isolado Curupira-2). Em um estudo anterior, DNA de *Hepatozoon* sp. encontrado em felídeos selvagens no Nordeste do Brasil foi posicionado no mesmo ramo que *H. felis* (METZGER et al., 2008), sugerindo que felídeos selvagens no Brasil possam ser parasitados por mais de uma espécie do agente sob estudo. Em relação à infecção por *Hepatozoon* sp. em felinos domésticos no Brasil, estudos anteriores mostraram que os mesmos podem ser parasitados por *H. canis* (RUBINI et al. 2006) e *H. felis* (DE BORTOLI et al., 2011), com base em estudos filogenéticos baseados no gene *18S rRNA*.

Embora DNA de *Hepatozoon* spp. tenha sido detectado em gatos-do-mato-pequeno e jaguatiricas dos estados do Maranhão e Ceará (METZGER et al., 2008) e em raposas do estado do Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006), nosso estudo representa a primeira detecção molecular deste parasita em suçuaranas, gatos-mourisco, cachorros-vinagre e lobos-guará no Brasil (ANDRÉ et al., 2010b).

O DNA de *Hepatozoon* sp. detectado nos felídeos selvagens amostrados no presente estudo e em felídeos selvagens dos estados do Maranhão e Ceará (METZGER et al., 2008) foi filogeneticamente próximo de isolados de *Hepatozoon felis* detectado em gatos da Espanha e em um gato da cidade de São Luís, Maranhão (Número de Acesso do GenBank JN123435) (DE BORTOLI et al., 2011). Ainda, o DNA de *Hepatozoon* sp. detectado em alguns canídeos selvagens no atual estudo foi filogeneticamente próximo ao isolado de *H. canis* genotipo "Spain 1", o qual se trata de uma genótipo comum entre raposas, mas não entre cães domésticos (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). Isolados de *Hepatozoon* sp. (Curupira 1, Curupira 3 e Curupira 4), filogeneticamente próximos ao isolado *H. canis* genotipo "Spain 1" também foram encontrados em raposas de vida livre no estado do Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). Também, DNA de *Hepatozoon* sp., filogeneticamente próximo a *H. americanum*, foi detectado em um cachorro-vinagre e um cachorro-do-mato amostrados no presente estudo (ANDRÉ et al., 2010b), assim como em um cachorro-do-mato em um estudo anterior (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

O DNA de *Hepatozoon* spp. detectado em mamíferos selvagens no nosso estudo (exceto pelos canídeos positivos para *Hepatozoon* sp. filogeneticamente próximo a *H. americanum*) formaram um cluster diferente daquele formado por isolados de *Hepatozoon* spp. encontrados em roedores, outros carnívoros e vertebrados inferiores, o que indica que carnívoros selvagens no Brasil são parasitados por mais de uma espécie, ou no mínimo, mais de um genótipo de *Hepatozoon* sp.

A prevalência de parasitismo por *Hepatozoon* spp. em felídeos selvagens no Brasil encontrada no presente estudo (3,6%) foi menor que aquela encontrada em felídeos neotropicais dos estados de Maranhão e Ceará (17,0%) (METZGER et al., 2008), felinos domésticos em Barcelona (16%) (ORTUÑO et al., 2008), gatos-selvagens de Iriomote (56,7%) e gatos-leopardo de Tsushima (14,3%) no Japão (KUBO et al., 2006). Já a prevalência de parasitismo por *Hepatozoon* spp. em canídeos selvagens encontrada no presente estudo (5,0%) foi menor que aquela encontrada em raposas em Portugal (48,0%) (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998), coiotes em Oklahoma, EUA (40,0%) (KOCAN et al., 2000a), cães domésticos no Brasil (53,3-77,39%) (O'DWYER et al., 2001; RUBINI et al., 2005; 2007; MUNDIM et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2009), raposas vermelhas na Espanha (40%) (GIMENEZ et al., 2009) e Itália (16%) (GABRIELLI et al., 2011). Por outro lado, a prevalência encontrada no presente estudo foi maior que aquela encontrada entre canídeos selvagens africanos (*Lycaon pictus*) (0,6%) (MATJILA et al., 2008) e gatos domésticos de São Luís do Maranhão (0,5%) (DE BORTOLI et al., 2011).

Considerando que a ingestão de carrapatos contendo oocistos do protozoário seja o principal modo de transmissão do *Hepatozoon* sp., a via de transmissão desta parasita no presente estudo não foi elucidada, uma vez que carrapatos não foram encontrados parasitando os animais. No Brasil, *H. canis* é transmitido por *Rhipicephalus sanguineus* (BANETH et al., 2001), *Amblyomma ovale* (FORLANO et al., 2005; RUBINI et al., 2009) e possivelmente por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (DE MIRANDA et al., 2011). Por outro lado, o carrapato vetor do *H. americanum*, *Amblyomma maculatum* (EWING et al., 2002) não foi encontrado no Brasil. Ainda, existe a possibilidade de que os animais positivos sob estudo tenham se infectado por meio da ingestão de presas contendo cistos de *Hepatozoon* sp. (MCCULLY et al., 1975; SMITH, 1996). A

transmissão vertical por via uterina tem sido relatada para *H. canis* em cães domésticos (MURATA et al., 1993). O comportamento de “grooming” observado entre esses animais para remoção de carrapatos pode facilitar a transmissão de *Hepatozoon* spp. (EAST et al., 2008).

Infecções por *Hepatozoon* sp. em animais selvagens são geralmente subclínicas (MUCCULLY et al., 1975; MERCER et al., 1978; AVERBECK et al., 1990; KOCAN et al., 2000a; METZGER et al., 2008; EAST et al., 2008). Os animais positivos para *Hepatozoon* spp. eram aparentemente assintomáticos. Entretanto, a infecção com *Hepatozoon* sp. em canídeos selvagens jovens têm sido associada com a presença de doença clínica em coiotes (KOCAN et al., 2000a; GARRET et al., 2005) e mortalidade em hienas (EAST et al., 2008). Adicionalmente, *Hepatozoon* spp. pode ser um patógeno potencial e um parasita oportunista em animais imunocomprometidos ou com enfermidades intercorrentes (DAVIS et al., 1978; BANETH et al., 1998; KUBO et al., 2006). No presente estudo, não foi verificada uma associação entre positividade para retrovírus (FIV e FeLV) e *Hepatozoon* sp. Futuros estudos devem ser conduzidos a fim de esclarecer se carnívoros selvagens no Brasil representam reservatórios de *Hepatozoon* spp. para outras espécies animais (DAVIS et al., 1978; MERCER et al., 1988; KOCAN et al., 2000a).

Em relação à presença de co-infecção por hemoparasitas nos carnívoros selvagens amostrados, verificou-se a ocorrência simultânea de infecção por agentes Anaplasmataceae (*Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp.), destes com *Hepatozoon*, de *Cytauxzoon* com micoplasmas hemotróficos, de hemoplasmas com *Cytauxzoon* e *Hepatozoon*, e de agentes Anaplasmataceae com *Cytauxzoon* em felídeos selvagens soropositivos para FIV. O potencial patogênico destes agentes para carnívoros selvagens no Brasil é ainda desconhecido, porém é possível que seja acentuado em casos de co-infecção e situações de estresse, podendo colocar a vida de espécies ameaçadas de extinção em risco. Se o parasitismo por uma espécie de hemoparasita predispõe a infecção por outro agente deverá ainda ser objeto de futuros estudos. Com base no exposto, sugere-se a elaboração de novos protocolos de quarentena, exames laboratoriais e cuidados com relação à translocação de animais entre instituições, a fim de contemplar as emergentes enfermidades transmitidas por carrapatos. Além disto,

precauções devem ser tomadas no que diz respeito à soltura de animais mantidos em cativeiro, uma vez que diferentes genótipos de agentes transmitidos por artrópodes devam circular em carnívoros selvagens de vida livre e cativeiro.

Considerando o fato de que um mesmo artrópode vetor possa estar transmitindo mais de um hemoparasita para um dado hospedeiro vertebrado, futuros estudos objetivando avaliar a capacidade vetorial de artrópodes para os agentes sob estudo são necessários, a fim da adoção de medidas de prevenção da transmissão destes agentes dentre a fauna selvagem, animais domésticos e seres humanos no Brasil. A identificação de artrópodes vetores permitirá a elaboração de futuros modelos espaciais de mapeamento de áreas de ocorrência e risco de infecção por estes agentes para a população humana no Brasil, com base na distribuição geográfica dos vetores envolvidos na transmissão destas enfermidades. Ainda, o isolamento e cultivo dos agentes em questão contribuirão para uma melhor caracterização molecular e antigênica dos patógenos, permitindo estudos de avaliação da capacidade patogênica destes hemoparasitas por meio de infecção experimental em animais selvagens e domésticos no Brasil, no que se refere à busca de reservatórios para os agentes sob estudo em nosso território.

## VII. CONCLUSÕES

- Canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil são expostos a espécies de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.;
- A caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae baseada em um fragmento de 350 pb do gene *16S rRNA* não permitiu a diferenciação das espécies dentro dos gêneros *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. que parasitam carnívoros selvagens no Brasil;
- *Ehrlichia canis* circula em canídeos selvagens no Brasil;
- A PCR em tempo real mostrou maior sensibilidade quando comparada aos protocolos de PCR convencional na detecção de *Anaplasma* spp. em amostras de sangue de carnívoros selvagens;
- Espécies relacionadas a agentes Anaplasmataceae (agentes das famílias Rickettsiaceae e Bartonellaceae) devem ser molecularmente diagnosticadas dentre os agentes transmitidos por carrapatos, em virtude das possíveis reações cruzadas na sorologia e grande proximidade filogenética;
- Felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil são expostos aos agentes da anemia infecciosa felina: *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, sendo este último mais prevalente que o primeiro;
- Canídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil são expostos aos agentes da anemia infecciosa canina (*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*) e anemia infecciosa felina (*Candidatus Mycoplasma haemominutum*);
- *Cytauxzoon* sp. circula em felídeos selvagens no Brasil;
- *Babesia* sp., filogeneticamente relacionada ao grupo da *Babesia leo*, circula entre felídeos selvagens no Brasil;
- Anticorpos anti-*Babesia* spp., quando detectados em amostras de soro de felídeos selvagens, representam reação cruzada com *Cytauxzoon* sp. e *Babesia* sp. filogeneticamente relacionada à *B. leo*;
- Canídeos e felídeos selvagens no Brasil são parasitados por uma espécie de *Hepatozoon* sp. filogeneticamente diferente de isolados de *Hepatozoon* sp. de outros animais pela análise filogenética de um fragmento do gene *18S rRNA*;

- *Hepatozoon* sp. filogeneticamente relacionado a *H. americanum* circula entre canídeos selvagens no Brasil.

## VIII. REFERÊNCIAS

ADANIA, C.H.; DINIZ, L.S.M.; GOMES, M.S.; FILONI, C.; SILVA, J.C.R. Avaliação das condições veterinárias e de manejo dos pequenos felinos neotropicais em cativeiro do Estado de São Paulo. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.1, p.44-54, 1998.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia sp.* no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.12, n.1, p.11-29, 1983.

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V.A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.70, p.279-282, 1997.

ALEXANDER, K.A.; KAT, P.W.; WAYNE, R.K.; FULLER, T.K. Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.30, n.4, p.486-91, 1994.

ALMOSNY, N.R.P.; ALMEIDA, L.E; MOREIRA, N.M.; MASSARD, C.L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.5, n.2, p.82-83, 1998.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose felina – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.4, n.23, p.30-32, 1999.

AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Red and gray foxes – potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.9, n.1, p.47-50, 1973.

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

ANDRÉ, M.R., ADANIA, C.H., MACHADO, R.Z., ALLEGRETI, S.M., FELIPPE, P.A.N., SILVA, K.F., NAKAGHI, A. C. H. Molecular detection of Ehrlichia spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.46, p.1017 - 1023, 2010b.

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

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; VARGAS, G.H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A.R.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.173, p.134 - 138, 2010b.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H.; DAGNONE, A.S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.45, p.234 - 237, 2009.

AVERBECK, G.A.; BJORK, K.E.; PACKER, C.; HERBST, L. Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.26, p.392-394, 1990.

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

BANETH, G.; KENNY, M.J.; TASKER, S.; UG, Y.; SHKAP, V.; LEVY, A.; SHAW, S.E. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis subsp. presentii*, in domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.1, p.99-105, 2004.

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**, Oxford, v.19, p.27-31, 2003.

BANETH, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; AROCH, I.; SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.87, p.606-611, 2001.

BATISTA, T.N. **Frequência de infecção do *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' em gatos (*Felis catus*)**. Botucatu, 2004. 44f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Disponível em: <<http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=200436733004064022P3>>.

BAUMANN, A. et al. *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: A Preliminary Study. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.35, n.3, p.370, 2006.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BERENT, L.M.; MESSICK, J.B.; COOPER, S.K.. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.59, n.10, p.1215-1220, 1998.

BIONDO, A.W.; DOS SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; VIEIRA, R.F.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotropic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.3 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.63, n.10, p.1385-1388, 2002.

BIRKENHEUER, A.J.; MARR, H; ALLEMAN, A.R.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B.. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 144-149, 2006.

BJÖERSDORFF, A.; SVENDENIUS, L.; OWENS, J.H.; MASSUNG, R.F. Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.40, n.1, p.20-24, 1999.

BLOUIN, E.F.; KOCAN, A.A.; GLENN, B.L.; KOCAN, K.M.; HAIR, J.A. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.20, p.241-242, 1984.

BLOUIN, E.F.; KOCAN, A.A.; KOCAN, A.A.; HAIR, J. Evidence of a limited shizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bob cats following exposure to infected ticks. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.23, p.499-501, 1987.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n.4, p.885-904, 2003.

BOSMAN, A.M.; VENTER, E.H.; PENZHORN, B.L. Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.144, n.1-2, p.33-38, 2006.

BOULOY, R.P.; LAPPIN, M.R.; HOLLAND, C.H.; THRALL, M.A.; BAKER, D.; O'NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.204, n.9, p.1475-1478, 1994.

BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babesiose canine à *Babesia canis*. **Le Point Veterinaire**, Maison Alfort, v.27, n.168, p.103-110, 1995.

BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: \_\_\_\_\_. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.796-803.

BREITSCHWERDT, E.B.; ANTHONY, C.G.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.16, n.6, p.642-649, 2002.

BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; CHOMEL, B.B.; LAPPIN, MR. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings.

**Journal of Veterinary Emergence and Critical Care**, San Antonio, v.20, n.1 p.8–30, 2010.

BROWN, H.M.; BERGHAUS, R.D.; LATIMER, K.S.; BRITT, J.O.; RAKICH, P.M.; PETERSON, D.S. Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.21, p.59-63, 2009a.

BROWN, H.M.; MODARESI, S.M.; COOK, J.L.; LATIMER, K.S.; PETERSON, D.S. Genetic variability of archived *Cytauxzoon felis* histologic specimens from domestic cats in Georgia, 1995-2007. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.21, n.4, p.493-498, 2009b.

BROWN, H.M.; LOCKHART, J.M.; LATIMER, K.S.; PETERSON, D.S. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.172, p.3-4, p.311-316, 2010.

BUORO, I.B.J.; ATWEL, R.B.; KIPTOON, J.C.; IHIGA, M.A. Feline anaemia associated with *Ehrlichia*-like bodies in three domestic short-haired cats. **Veterinary Record**, London, v.17, n.125, p.434-436, 1989.

BUORO, I.B.J.; NYAMWANGE, S.N.; KIPTOON, J.C. Presence of *Ehrlichia*-like bodies in monocytes of adult lioness. **Feline Practice**, Santa Barbara, v.1, n.22, p.36-37, 1994.

BUTT, M.T.; BOWMAN, D.; BARR, M.C.; ROELKE, M.E. Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from a Florida panther (*Felis concolor coryi*) to a domestic cat. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.27, n.2, p.342-347, 1991.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R.; WALKER, D.H. Human Ehrlichiosis in Brazil: first suspect cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.8, n.3, p.259-262, 2004.

CARPANO, M. Sur les piroplasmoses carnassiers et sur un nouveau piroplasma des félins (*Babesiella felis* chez le puma: *Felis concolor*). **Bull. Tech. Sci. Serv., Min. Agric.**, Egypt, v.137, p.1–26, 1934.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.46, n.3, p.298-303, 1999.

CASPERSEN, K.; PARK, J.H.; PATIL, S.; DUMLER, J.S. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophilum* msp2 (p44). **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.3, p.1230-1234, 2002.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; DE AQUINO, L.P.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.19, n.1, p.73-86, 2004.

CATUREGLI, P.; ASANOVICH, K.M.; WALLS, J.J.; BAKKEN, J.S.; MADIGAN, J.E.; POPOV, V.L.; DUMLER, J.S. *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.9, p.5277-5283, 2000.

CHAE, J.S.; KIM, E.H.; KIM, M.S.; KIM, M.J.; CHO, Y.H.; PARK, B.K.. Prevalence and sequence analyses of *Neorickettsia risticii*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.990, p.248-256, 2003.

CIERVO, A.; CICERONI, L. Rapid detection and differentiation of *Bartonella* spp. by a single-run real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.18, p.307–312, 2004.

CLANSEY, B.; HORNEY, N; BURTON, S.; BIRKENHEUER, A.; MCBURNEY, S.; TEFFT, K. *Babesia* (*Theileria annae*) in a red fox (*Vulpes vulpes*) from Prince Edward Island, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.46, p.615-621, 2010.

COLBORN, J.M.; KOSOY, M.Y.; MOTIN, V.L.; TELEPNEV, M.V.; VALBUENA, G.; MYINT, K.S.; FOFANOV, Y.; PUTONTI, C.; FENG, C.; PERUSKI, L. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.48, n.12, p.4630-4633, 2010.

COLLY, L.P.; NESBIT, J.W. Fatal acute babesiosis in a juvenile wild dog (*Lycaon pictus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v.63, n.1, p.36-38, 1992.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n4, p.863-884, 2003.

COHN, L.A.; BIRKENHEUER, A.J.; BRUNKER, J.D.; RATCLIFF, E.R.; CRAIG, A.W. Efficacy of atovaquone and azithromycin or imidocarb dipropionate in cats with acute cytauxzoonosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.25, n.1, p.55-60, 2011.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; JANZ, J.G. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.24, p.344-347, 1988.

COIMBRA, H.S.; FERNANDES, C.G.; SOARES, M.P.; MEIRELES, M.C.A.; RADAMÉS, R.; SCHUCH, L.P.D. Erliquiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.97-101, 2006.

COIMBRA, H.S.; SCHUCH, L.F.D.; VEITENHEIMER,-MENDES, I.L.; MEIRELES, M.C.A. *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no Rio Grande do Sul: *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobiidae) e *Parapleurolophocephalus cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.325-329, 2005.

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

COSTA, P.S.G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of new nine cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.10, n.1, p.7-10, 2006.

CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; CASADO, N.; GIMENEZ, C.; RUAS, J.; WENDT, L.; DA ROSA-FARIAS, N.; PINHEIRO, M.; REY-VALEIRON, C.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v.54, p.187-193, 2009.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.113, n.3-4, p.189-201, 2003a.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.114, n.3, p.173-194, 2003b.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.93, n.4, p.307-317, 2003c.

CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RIO; M.A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. The “expanding universe of piroplasms”. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 337-345, 2004.

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

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, RZ. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.4, p.20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

DAWSON, J.E.; ABEYGUNAWARDENA, I.; HOLLAND, C.J.; BUESE, M.M.; RISTIC, M. Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine

monocytic ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.12, n.49, p.2096-2100, 1988.

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

DAVIS, L.J. On a piroplasm of the Sudanese cat (*Felis ocreata*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.22, p.523-534, 1929.

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

DEAN, R.S.; HELPS, C.R.; JONES, T.J.G.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in the saliva and salivary glands of hemoplasma-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, n.4, p.413-417, 2008.

DE BORTOLI, C.P.; ANDRÉ, M.R., BRAGA, M.S.C.; MACHADO, R.Z. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. in cats from São Luís Island, Maranhão, Northeastern Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v.109, n.4, p.1189-1192, 2011.

DE MIRANDA, R.L.; DE CASTRO, J.R.; OLEGÁRIO, M.M.; BELETTI, M.E.; MUNDIM, A.V.; O'DWYER, L.H.; EYAL, O.; TALMI-FRANK, D.; CURY, M.C.; BANETH, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.177, n.3-4, p.392-396, 2011.

DENNIG, H.K. Eine unbekante Babesienart beim jaguarondi (*Herpailurus yagouaroundi*). **Kleintierpraxis**, Hannover, v.12, p.146-152, 1967.

DENNIG, H.K.; BROCKLESBY, D.W. *Babesia pantherae* new species, a piroplasm of the leopard *Panthera pardus*. **Parasitology**, Cambridge, v.64, n.3, p.525-532, 1972.

DEZDEK, D.; VOJTA, L.; CURKOVIĆ, S.; LIPEJ, Z.; MIHALJEVIĆ, Z.; CVETNIĆ, Z.; BECK, R. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.72, n.3-4, p.333-336, 2010.

DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; DE OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.14, n.12, p.1922-1924, 2008.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCK, K.C.; LI, P.; WALKER, D.C.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taq-Man Real Time PCR of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v.7, p.504-510, 2005.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; STUART, C.R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.6, p.2145-2165, 2001.

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**, Ames, v.44, p.45-52, 2008.

EVERS, H.V.; KOCAN, A.A.; REICHARD, M.V.; MEINKOTH, J.H. Experimental *Babesia gibsoni* infection in coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n.4, p.904-904, 2003.

EWING, B., HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, New York, v.8, n.3, p.175-198, 1998.

EWING, S.A. Canine ehrlichiosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.13, p.331-353, 1969.

EWING, S.A.; DUBOIS, J.G.; MATHEW, J.S.; PANCIERA, J.R. Larval Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) (Acari: Ixodidae) as host for *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, p.453-470, 2002.

EWING, S.A.; PANCIERA, R.J. American canine hepatozoonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.4, p.688-97, 2003.

FARIA, J.L.; DAGNONE, A.S.; MUNHOZ, T.D.; JOÃO, C.F.; PEREIRA, W.A.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.2, p.98-102, 2010.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; BAY, G.; DURIGON, E.L.; JORGE, R.S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.42, n.2, p.470-477, 2006.

FISHMAN, Z.; GONEN, L.; HARRUS, S.; STRAUSS-AYALI, D.; KING, R.; BANETH, G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.119, n.1, p.21-26, 2004..

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; JECKER, M.; SWIFT, P.K.; MADIGAN, J.E. Granulocytic Ehrlichiosis and tick infestation in mountains lions in California. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.35, n.4, p. 703-709, 1999.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.59, n.12, p.1581-1588, 1998.

FORLANO, M.; SCOFIELD, R.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWINGII, S.A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.134, p.1-7, 2005.

FURUTA, P.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; TEIXEIRA, M.C.A.; ROCHA, A.G.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.. Comparison between a soluble antigen based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, p.41-45, 2009.

FUTTER, G.J.; BELONJE, P.C. Studies on feline babesiosis.1. Historical review. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.51, n.2, p.105-106, 1980a.

FUTTER, G.J.; BELONJE, P.C. Studies on feline babesiosis. 2. Clinical observations. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.51, n.3, p.143-146, 1980b.

FUTTER, G.J.; BELONJE, P.C.; VAN DEN BERG, A. Studies on feline babesiosis. 3. Haematological findings. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.51, n.4, p.271-280, 1980.

FUTTER, G.J.; BELONJE, P.C.; VAN DEN BERG, A.; VAN RIJSWIJK, A.W. Studies on feline babesiosis. 4. Clinical pathology; macroscopic and microscopic *post mortem* findings. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.52, n.1, p.5-14, 1981.

FYUMAGWA, R.D.; SIMMLER, P.; WILLI, B.; MELI, M.L.; SUTTER, A.; HOARE, R.; DASEN, G.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. *Mycoplasma* species in *Rhipicephalus sanguineus* tick species collected on lions (*Panthera lion*) from Ngorongoro, Tanzania. **South Africa Journal of Wildlife Research**, v.38, p.117-122, 2008.

GABRIEL, M.W.; BROWN, R.N.; FOLEY, J.E.; HIGLEY, J.M.; BOTZLER, R.G. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 45, n.2, p.344-54, 2009.

GABRIELLI, S.; KUMLIEN, S.; CALDERINI, P.; BROZZI, A.; IORI, A.; CANCRINI, G. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v.10, n.9, p.855-859, 2010.

GARNER, M.M.; LUNG, M.P.; CITINO, S.; GREINER, E.C.; HARVEY, J.W.; HOMER, B.L. Fatal cytauxzoonosis in a captive reared white tiger (*Panthera tigris*). **Veterinary Pathology**, Washington, v.33, p.82-86, 1996.

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

GAZETA, G.S.; MONTEIRO, A.; ABOUD-DUTRA, A.E. Babesiose felina no Brasil: uma nova espécie? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 13, p. 228, 2004.

GIBSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; ZHANG, C.; MARTIN, C. *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7, n.2, p.203-12, 2005.

GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, A.; MIGUEL, F.A.; DOMINGUEZ-PEÑAFIEL, G. A molecular survey of Piroplasmida and *Hepatozoon* isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.162, p.147-150, 2009.

GLENN, B.L.; KOCAN, A.A.; BLOUIN, E.F. Cytauxzoonosis in bobcats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.183, n.11, p.1155-1158, 1983.

GLENN, B.L.; ROLLEY, R.E.; KOCAN, A.A. *Cytauxzoon*-like piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.181, p.1251-1253, 1982.

GROEN, J.; KORAKA, P.; NUR, Y.A.; AVSIC-ZUPANC, T.; GOESSENS, W.H.; OTT, A.; OSTERHAUS, A.D. Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.21, n.1, p.46-49, 2002.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.1, p.937-940, 1975.

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

HABER, M.D.; TUCKER, M.D.; MARR, H.S.; LEVY, J.K.; BURGESS, J.; LAPPIN, M.R.; BIRKENHEUER, A.J. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.146, p.3-4, 316-320, 2007.

HAEFNER, M.; BURKE, T.J.; KITCHELL, B.E.; LAMONT, L.A.; SCHAEFFER, D.J.; BEHR, M.; MESSICK, J.B. Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v.34, p.139–143, 2003.

HAN, J.I.; LEE, S.J.; JANG, H.J.; NA, K.J. Asymptomatic *Babesia microti*-like parasite infection in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.46, p.632-635, 2010.

HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; PITULLE, C. Differentiation of *Ehrlichia platys* and *E. equi* infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.12, p.4577-4578, 2001.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.35, v.11-12, p.1309-1318, 2006.

HEADLEY, S.A.; SCORPIO, D.G.; BARAT, N.C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J.S. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.12, n.9, p.1303-1305, 2006.

HEADLEY, S.A.; SCORPIO, D.G.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J.S. *Neorickettsia helminthoeca* and salmon poisoning disease: a review. **The Veterinary Journal**, London, v.187, n.2, p.165-73, 2011.

HOLMAN, P.L.; SNOWDEN, K.F. Canine hepatozoonosis and babesiosis, and feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.39, p.1035-1053, 2009.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.

HORA, A.S. **Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos**. São Paulo, 2008. 115f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, canine hepatozoonosis and feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.21, n.1, p.129-140, 1991.

INAYOSHI, M.; NAITOU, H.; KAWAMORI, F.; MASUZAWA, T. OHASHI, N. Characterization of ehrlichia species from *Ixodes ovatus* ticks at the Foot of Mt.Fuji, Japan. **Microbiology and Immunology**, Tóquio, v.48, n.10, p.737-745, 2004.

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.9, p.3031-9 2001a.

INOKUMA, H.; PAROLA P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi prefecture, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.99, n.4, p.335-339, 2001b.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S *rRNA* gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.106, p.265-271, 2002.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.7, p.1658-1662, 1994.

JACKSON, C.B.; FISHER, T. Fatal cytauxzoonosis in a Kentucky cat (*Felis domesticus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, p.192-195, 2006.

JACOBSON, L.X.; SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R.G. A survey of feline babesiosis in South Africa. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.71, n.4, p.222-228, 2000.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.144, p.20-27, 2007.

JOHNSON, E.M.; ALLEN, K.E.; PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; LITTLE, S.E.; REICHARD, M.V. Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.150, n.1-2, p.27-32, 2007.

Johnson, E.M.; Allen, K.E.;Panciera, R.J.; Ewing, S.A.; Little, S.E. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.164, n.2-4, p.162-166.

KAKOMA, I.; MEHLHORN, H. Babesia of domestic animals. In:\_\_\_\_\_.KREIER, J.P. **Parasitic protozoa**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1994. v.7, p.141-216.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.11, p.5397–5399, 2004.

KETZ-RILEY, C.J.; REICHARD, M.V.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; HOOVER, J.P.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A.A. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Palla´s cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.39, p.424-430, 2003.

KEWISH, K.E.; APPLEYARD, G.D.; MYERS, S.L.; KIDNEY, B.A.; JACKSON, M.L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.45, p.749-752, 2004.

KIER, A.B.; WAGNER, J.E.; KINDEN, D.A. The pathology of experimental cytauxzoonosis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.97, p.415-429, 1987.

KJEMTRUP, A.M.; CONRAD, P.A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, n.11-12, p.1323-1337, 2000.

KJEMTRUP, A.M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T.; CONRAD, P.A. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasms isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. **Parasitology**, Cambridge, v.120, n.5, p.487-493, 2000.

KOCAN, A.A.; BLOUIN, E.F.; GLENN, B.L. Hematologic and serum chemical values for free-ranging bobcats, *Felis rufus* (Schreber) with reference to animals with natural infections of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.21, n.2, 190-192, 1985.

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**, Ames, v.36, p.149-153, 2000a.

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

KUBO, M.; JEONG, A.; KIM, S.I.; KIM, Y.J.; LEE, H.; KIMURA, J.; AGATSUMA, T.; SAKAI, H.; YANAI, T. The first report of *Hepatozoon* species infection in leopard cats (*Prionailurus bengalensis*) in Korea. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.96, n.2, p.437-439, 2010.

KUBO, M.; MIYOSHI, N.; YASUDA, N. Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v.68, p.833-837, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v.5, p.150-163, 2004.

LAPPIN, M.R. Update on the diagnosis and management of *Hepatozoon* spp infections in dogs in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p.142-144, 2010.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Lawrence, v. 225, n. 6, p. 893-896, 2004.

LAPPIN, M.R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M.M.; JENSEN, W.A. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n.2, p.85-90., 2006.

LEE, K.N.; PADMALAYAM, I.; BAUMSTARK, B.; BAKER, S.L.; MASSUNG, R.F. Characterization of the *ftsZ* gene from *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia rickettsii*, and use as a differential PCR target. **DNA and Cell Biology**, New York, v.22, n.3, p.179-186, 2003.

LITTLE, S.E.; ALLEN, K.E.; JOHNSON, E.M.; PANCIERA, R.J.; REICHARD, M.V.; EWING, S.A. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. **Parasite & Vectors**, Suppl 1:S5, 2009.

LIZ, J.S.; ANDERES, L.; SUMNER, J.W.; MASSUNG, R.F.; GERN, L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. PCR detection of granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild mammals in western Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.3, p.1002-1007, 2000.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 20, n. 4, p. 418-431,1998.

LOPEZ-REBOLLAR, L.M.; PANZHORN, B.L.; WAAL, D.T.; LEWIS, B.D. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n. 1, p. 82-85, 1999.

LOTTRIC-FURLAN, S.; PETROVEC, M.; ZUPANC, T.A.; NICHOLSON, W.L.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E.; STRLE, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.27, p.424-428, 1998.

LUACES, I.; AGUIRRE, E.; GARCIA-MONTIJANO, M.; VELARDE, J.; TESOURO, M.A.; SÁNCHEZ, C.; GALKA, M.; FERNÁNDEZ, P.; SAINZ, A. First report of an intra-erythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.41, p.810-815, 2005.

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUSA, E.; GAVIOLI, F.A. ALVES-JÚNIOR, J.R.F. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Ehrlichia* and *Anaplasma* species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, 2012 (in press).

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.P.J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, n.1-3, p.262-266, 2006.

MACIEIRA, D.B.; DE MENEZES, R.DE C., DAMICO, C.B.; ALMOSNY, N.R.; MCLANE, H.L.; DAGGY, J.K.; MESSICK, J.B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, n.2, p.120-129, 2008.

MARQUARDT, W.C.; DEMAREE, R.X.; GRIEVE, R.B. **Parasitology and vector biology**. 2<sup>nd</sup>. ed. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000. p. 211-224.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.2, p.717-22, 2003.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.

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

MATHEW, J.S.; SALIKI, J.T.; EWING, S.A.; LEHENBAUER, T.W.; PANCIERA, R.J.; MALAYER, J.R.; CUMMINGS, C.A.; KOCAN, A.A. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of American canine hepatozoonosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.13, n.1, p.17-21, 2001.

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

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v.71, n.2, p.491-499, 1988.

MEINKOTH, J.H.; KOCAN, A.A. Feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.35, p.89-101, 2005.

MEINKOTH, J.H.; KOCAN, A.A.; WHITWORTH, L.; MURPHY, G.; FOX, J.C.; WOODS, J.P. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.14, p.521-525, 2000.

MELIANI, P.; KHABITI, S.; RANDAZOO, S.; GORENFLOT, A.; MARCHOU, B. Babésioses humaines. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v.36, n.10, p.499-504, 2006.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M.C.; BRANCO, A.S.; SERRÃO, M.L.; SOUZA, A.M.; ALMOSNY, N.; CHARME, M.; LABARTHE, N. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 46, n.5, p.269-274, 2004.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.; GUERRERO, J.; FARIA, M.C.; BRANCO, A.S.; PEREIRA, C.D.; BARREIRA, J.D.; PEREIRA, M.J. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.147, n.1-2, p.9-15. 2007.

MERCER, S.H.; JONES, L.P.; RAPPOLE, J.H.; TWED, D.; LAACK, L.L.; CRAIG, T.M. *Hepatozoon* sp. in wild carnivores in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 24, p.574-576, 1988.

MESSICK, JB. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n.6, p.1453-65, 2003.

MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P. Identification, bioinformatics analyses, and expression of immunoreactive antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**. Washington, v.18, n.8, p.1275-81, 2011.

METZGER, B.; PADUAN, K.S.; RUBINI, A.S.; OLIVEIRA, T.G.; PEREIRA, C.; O'DWYER, L.H. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.152, p.28-33, 2008.

MILLÁN, J.; NARANJO, V.; RODRÍGUEZ, A.; LA LASTRA, J.M.P; MANGOLD, A.J.; LA FUENTE, J. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. **Parasitology**, Cambridge, v.134, n.7, p.995-1001, 2007.

MOLIA, S.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; LEUTENEGGER, C.M.; STEELE, B.R.; MARKER, L.; MARTENSON, J.S.; KEET, D.F.; BENGIS, R.G.; PETERSON, R.P.; MUNSON, L.; O'BRIEN, S.J. Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.100, n.1-2, p.31-41, 2004.

MORICK, D.; BANETH, G.; AVIDOR, B.; KOSOY, M.Y.; MUMCUOGLU, K.Y.; MINTZ, D.; EYAL, O.; GOETHE, R.; MIETZE, A.; SHPIGEL, N.; HARRUS, S. Detection of *Bartonella* spp. in wild rodents in Israel using HRM real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.139, n.3-4, p.293-7, 2009.

MOTZEL, S.L.; WAGNER, J.E. Treatment of experimentally induced cytauxzoonosis in cats with parvaquone and buparvaquone. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.35, p.131-138, 1990.

MUDALIAR, S.V.; ARCHARY, G.R.; ALWAR, V.S. On a species of *Babesia* in an Indian wild cat (*Felis catus*). **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 26, p. 391-395, 1950.

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**, Amsterdam, v.153, p.3-8, 2008.

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

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

MUSEUX, K.; BORETTI, F.S.; WILLI, B., RIOND; B., HOELZLE; K., HOELZLE, L.E.; WITTENBRINK, M.M.; TASKER, S.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. In vivo transmission studies of *Candidatus Mycoplasma turicensis* in the domestic cat. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.40, n.5, p.45, 2009.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.91, n.2-3, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H., MACHADO, R.Z., TINUCCI-COSTA, M., ANDRÉ, M.R., BALDANI, C.D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.766 - 770, 2008.

NEER, T.M. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of dog and cat. Philadelphia: WB Saunders. 1998. p. 139-147.

NICHOLSON, W.L.; CASTRO, M.B.; KRAMER, V.L.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E. Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3323-3327, 1999.

NIETFIELD, J.C.; POLLOCK, C. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.38, p.607-610, 2002.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, F.; CECI, C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.142, n.3-4, p.276-284, 2009.

NYINDO, M.B.A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; SMITH, A.R. Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent – *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.32, n.1, p.1651-1658, 1971.

OBARA, H.; FUJIHARA, M.; WATANABE, Y.; ONO, H.K.; HARASAWA, R. A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.73, n.6, p.841-3, 2011.

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

O'DWYER, L.H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C.L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis*, em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.4, p.83-84, 1997.

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**, Amsterdam, v.94, p.143-150, 2001.

OLIVEIRA, T.M.; FURUTA, P.I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.15, n.1, p.7-1, 2008.

ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1289-1295, 2004.

ORTUÑO, A.; CASTELLÀ, J.; CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; BARBARRETERO, J.C. Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. **The Veterinary Journal**, London, v.177, p.134-135, 2008.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A. American canine hepatozoonosis. **Animal Health Research Reviews**, v.4, n.1, p.27-34, 2003.

PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.1, p.37-64, 2003.

- PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.3, p.469-92, 2005.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.
- PEAVY, G.M.; HOLLAND, C.J.; SUKANTA, K.D.; SMITH, G.; MOORE, A.; RICH, L.J.; LAPPIN, M.R.; RITCHTER, K. Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.210, n.2, p.231-234, 1997.
- PEIXOTO, P.V.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T.N.; BARROS, S.S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.145, n.3-4, p.383-387, 2007.
- PENZHORN, B. L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.31, n.1, p.11-21, 2006.
- PENZHORN, B.L.; KJEMTRUP, A.M.; LÓPEZ-REBOLLAR, L.M.; CONRAD, P.A. *Babesia leo n. sp.* from lions in the Kruger National Park, South Africa, and the relations to other piroplasms. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.87, n.3, p.681-685, 2001.
- PENZHORN, B.L.; LEWIS, B.D.; LÓPEZ-REBOLLAR, L.M.; SWAN, G.E. Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.71, n.1, p.53-57, 2000.
- PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis in South Africa: a review. **Annals of New York Academy Sciences**, New York, v. 1026, p. 183-186, 2004.

PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis: an endemic South African disease. **Japanese Journal of Veterinary Parasitology**, v.5, n.1, p.1-7, 2006.

PEREZ, R.R.; RUBINI, A.E.; O'DWYER, L.H. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v.94, p.83-85, 2004.

PERSING, D.H. **PCR protocols for emerging infectious diseases. A supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C.: ASM Press, 1996, 180 p.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; MCAULIFFE, L.; NEIMARK, H.; LAPPIN, M.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J.; HOELZLE, L.E.; WILLI, B.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. RNase P RNA gene (*rnpb*) phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.46, n.5, p.1873-1877, 2008.

PITULLE, C.; CITRON, D.M.; BOCHNER, B.; BARBERS, R.; APPLEMAN, M.D. Novel bacterium isolated from a lung transplant patient with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.3851-3855, 1999.

POTGIETER, F.T. Chemotherapy of *Babesia felis* infection: efficacy of certain drugs. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.52, n.4, p.289-293, 1981.

PRAKASH, J.A.J.; RELLER, M.E.; BARAT, N.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 292-293, 2009.

PRICE, J.E.; KARSTAD, L.H. Free-living jackals (*Canis mesomelas*)-potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis* in Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, v.16, n.4, p.469-73, 1980.

PUSTERLA, N.; CHANG, C.C.; CHOMEL, B.B.; CHAE, J.S.; FOLEY, J.E.; DEROCK, E.; KRAMER, V.L.; LUTZ, H.; MADIGAN, J.E. Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.36, n3, p.494-9, 2000.

PUSTERLA, N.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.4, p.1168-9, 1999.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, Berlin, v.107, p.1115-1120, 2010.

REICHARD, M.V.; MEINKOTH, J.H.; EDWARDS, A.C.; SNIDER, T.A.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; LITTLE, S.E. Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.161, n.1-2, p.110-115, 2009.

REICHARD, M.V.; EDWARDS, A.C.; MEINKOTH, J.H.; SNIDER, T.A.; MEINKOTH, K.R.; HEINZ, R.E.; LITTLE, S.E. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileridae) to domestic cats. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.47, n.5, 2010.

REICHARD, M.V.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; MEINKOTH, J.; HOOVER, J.P.; KOCAN, A.A. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments

on the systematics and taxonomy of piroplasmids. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.91, p.420-426, 2005.

REJMANEK, D.; BRADBURD, G.; FOLEY, J. Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. **Journal of Medical Microbiology**, Londres, 2011 (in press).

RELLER, M.E.; CLEMENS, E.G.; PRAKASH, J.A.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum*. In: **23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology**. Hilton Head Island, SC; 2009: Abstract no. 51.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 704-709.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, M.B.A. Serological diagnosis of canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**, Washington, v.6, n.3, p.226-231, 1972.

ROTSTEIN, D.S.; TAYLOR, S.K.; HARVEY, J.W.; BEAN, J. Haematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.35, n.3, p.613-617, 1999.

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; O'DWYER, L.H. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.164, p.324-327, 2009.

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

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; LOPES, V.V.A.; O'DWYER, L.H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v.102, p.895-899, 2007.

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

RYSER-DEGIORGIS, M. P.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LEUTENEGGER, C. M.; SEGERSTAD, C. H.; MÖRNER, T.; MATTSSOM, R.; LUTZ, H. Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.41, n.1, p.58-66, 2005.

SACCHI, A.B.V. **Identificação e prevalência de agentes Rickettsiais (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) utilizando métodos sorológico e molecular**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SAKUMA, M.; NISHIO, T.; NAKANISHI, N.; IZAWA, M.; ASARI, Y.; OKAMURA, M.; SHIMOKAWA-MIYAMA, T.; SETOGUCHI, A.; ENDO, Y. A case of Iriomote cat (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) with *Hepatozoon felis* parasitemia. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v.73, n.10, p.1381-1384, 2011.

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

SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J.S.; ANDRADE, G.M.; BALDANI, C.D.; MACHADO, RZ. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.3, p.135-140, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; OLIVEIRA, S.T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C.S.; LACERDA, L.A.; ESTEVES, V.S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZÁLEZ, F.H. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of *Candidatus Mycoplasma turicensis* 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.38, n.4, p.443-452, 2009.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D., THOME, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.23, n.4, p.770-774, 2011.

SCHOEMAN, T.R.G.; LOBETTI, R.G.; JACOBSIN, L.S.; PENZHORN, B.L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and co-infections. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.72, n.1, p.4-11, 2001.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, N.; ARYIADASA, S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, London, v.14, p.112-114, 1973.

SHAMIR, M.; YAKOBSON, B.; BANETH, G.; KING, R.; DAR-VERKER, S.; MARKOVICS, A.; AROCH, I. Antibodies to selected canine pathogens and infestation

with intestinal helminths in golden jackals (*Canis aureus*) in Israel. **The Veterinary Journal**, London, v.162, p.1, n.66-72, 2001.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, n.4, p.193-209, 2001.

SHAW, S.E.; KENNY, M.J.; TASKER, S.; BIRTLES, R.J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.102, n.3-4, p.183–188, 2004.

SHOCK, B.C.; BIRKENHEUER, A.J.; PATTON, L.L.; OLFENBUTTEL, C.; BERINGER, J.; GROVE, D.M.; PEEK, M.; BUTFILOSKI, J.W.; HUGHES, D.W.; LOCKHART, M.J.; CUNNINGHAM, M.W.; YABSLEY, M.J. Extensive variation in the ITS-1 and ITS-2 regions of *Cytauxzoon felis* from wild felids in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2011 (in press).

SHOCK, B.C.; MURPHY, S.M.; PATTON, L.L.; SHOCK, P.M.; OLFENBUTTEL, C.O.; BERINGER, J.; PRANGE, S.; GROVE, D.M.; PEEK, M.; BUTFILOSKI, J.W.; HUGHES, D.W.; LOCKHART, J.M.; BEVINS, S.N.; VANDEWOUDE, S.; CROOKS, K.R.; NETTLES, V.F.; BROWN, H.W.; PETERSON, D.S.; YABLSEY, M.J. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.175, p.325-330, 2011.

SIRIGIREDDY, K.R.; GANTA, R.R. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v.7, n.2, p.308-316, 2005.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick

*Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.37, n.2, p.119-125, 1976.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.82, p.565-585, 1996.

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 Spirit Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.163, p.357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.; MELO, A.L.; IGARASHI, M.; AMUDE, A.M.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.20, n.3, p.253-255, 2011.

SRÉTER, T.; SRÉTER-LANCZ, Z.; SZÉLL, Z.; KÁLMÁN, D. *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and Central Eastern Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 98, n.4, p.401-405, 2004.

STEWART, C.G.; HACKETT, K.J.W.; COLLETT, M.G. An unidentified *Babesia* at the domestic cat (*Felis domesticus*). **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v.51, n.4, p.219-221, 1980.

STUBBS, C.J.; HOLLAND, C.J.; REIF, J.S.; WHEELER, S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M.R. Feline ehrlichiosis. **The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarians**, Princeton, v.22, n.4, p.307-318, 2000.

SUMNER, J.W.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F. PCR amplification and comparasion of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p.2087-2092, 1997.

SYKES, J.E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v.20, n.1, p.62-69, 2010.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.55, n. 1, p.27-30, 2005.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 473-481.

TAILLARDT-BISCH, A.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. RNA polymerase  $\beta$ -subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p. 455-458, 2003.

TAMÍ, I. DEL. C. DE.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. em las plaquetas de pacientes com infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Revista Panamericana de Salude Publica**, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. **Veterinary Record**, London, v.156, n.24, p.772-774, 2005.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of *Candidatus* Mycoplasma haemominutum and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v.67, n.12, p.1277-1279, 2005.

TASKER, S. Hemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, n.5, p.369-381, 2010.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.4, n.1, p.3-11, 2002.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Acid Nucleics Research**, v.22, p.1673-4680, 1994.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; DE MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.140, n.1-2, p.177-180, 2006.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D.. Canine ehrlichiosis. In: \_\_\_\_\_. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.404-418.

UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

UILENBERG, FRANSENN, F.F.; PERIE, N.M.; SPANJER, A.A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.11, n.1, p.33-40, 1989.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.8, p.2788-93, 2001.

VAN HEERDEN, J. The transmission of canine ehrlichiosis to the wild dog *Lycaon pictus* (Temminck) and black-backed jackal *Canis mesomelas* Schreber. **Journal of South African Veterinary Association**, v.50, n.4, p.245-248, 1979.

VAN HEERDEN, J.; MILLS, M.G.; VAN VUUREN, M.J.; KELLY, P.J.; DREYER, M.J. An investigation into the health status and diseases of wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Kruger National Park. **Journal of South African Veterinary Association**, v.66, n.1, p.18-27, 1995.

VINCENT-JOHNSON, N.A. American canine hepatozoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n.4, p.905-920, 2003.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, n.1, p.18-29, 1996.

WALKER, D.H.; PADDOCK, C.D.; DUMLER, J.S. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 92, p.1345-1361, 2008.

WANER, T.; BANETH, G.; STRENGER, C.; KEYSARY, A.; KING, R.; HARRUS, S. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogrup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, p.121-128, 1999.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEUSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.1, p.1-15, 2001.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and

molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.126, p.132–141, 2008.

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

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M.L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.6, p.2581-2585, 2005.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; TASKER, S.; MELI, M.L.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.125, n.3-4, p.197-209, 2007a.

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

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.66, n.6, p.1008–1012, 2005.

WOODS, J.E.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Attempted transmission of *Candidatus* Mycoplasma haemominutum and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.67, n.3, p.494-497, 2006.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.21, n.1, p.75-98, 1991.

WORMSER, G.P.; DATTWYLER, R.J.; SHAPIRO, E.D.; HALPERIN, J.J.; STEERE, A.C.; KLEMPNER, M.S.; KRAUSE, P.J.; BAKKEN, J.S.; STRLE, F.; STANEK, G.; BOCKENSTEDT, L.; FISH, D.; DUMLER, J.S.; NADELMAN, R.B. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.43, n.9, p. 089-1134, 2006.

YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STALLKNECHT, D.E.; VARELA, A.S.; SWIFT, P.K.; DEVOS, J.C. JR.; DUBAY, S.A. Evidence of tick-borne organisms in mule deer (*Odocoileus hemionus*) from the western United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v.5, n.4, p.351-362, 2005.

YABSLEY, M.J.; MURPHY, S.M.; CUNNINGHAM, M.W. Molecular detection and characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* species in cougars from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.42, n.2, p.366-374, 2006.

YU, X.; MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, n.3-4, p.337-346, 2006.

ZAMOTO, A.; TSUJI, M.; WEI, Q.; CHO, S.H.; SHIN, E.H.; KIM, T.S.; LEONOVA, G.N.; HAGIWARA, K.; ASAKAWA, M.; KARIWA, H.; TAKASHIMA, I.; ISHIHARA, C. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern

Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v.66, n.7, p.785-792, 2004.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.84, n.7, p.544-548, 1998.

ZHANG, J.; POPOV, V.L.; GAO, S.; WALKER, D.H.; YU, X. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.9, n.3, p.610-618, 2006.

ZHUANG, Q.J.; ZHANG, H.J.; LIN, R.Q.; SUN, M.F. The occurrence of the feline *Candidatus* Mycoplasma haemominutum in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.41, n.4, p.689–692, 2009.