

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

**IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE AGENTES  
RICKETTSIAIS (RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE)  
EM CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*),  
UTILIZANDO MÉTODOS SOROLÓGICO E MOLECULAR**

**Ana Beatriz Vieira Sacchi**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

Sacchi, Ana Beatriz Vieira  
S119i Identificação e Prevalência de Agentes Rickettsiais (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus*) utilizando métodos sorológico e molecular / Ana Beatriz Vieira Sacchi. -- Jaboticabal, 2009  
xiv, 76 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Rosângela Zacarias Machado

Banca examinadora: José Maurício Barbanti Duarte, Natalino Hajime Yoshinari

Bibliografia

1. Anaplasmataceae. 2. Cervo-do-pantanal. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Reação de Imunofluorescência Indireta. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.616-072:639.111.1

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

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

**IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE AGENTES  
RICKETTSIAIS (RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE)  
EM CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*),  
UTILIZANDO MÉTODOS SOROLÓGICO E MOLECULAR**

**Ana Beatriz Vieira Sacchi**

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

Jaboticabal - SP  
Novembro de 2009

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ANA BEATRIZ VIEIRA SACCHI** - nascida na cidade de Mirassol, São Paulo, em 03 de abril de 1981. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual de Primeira Grau Professor Edmur Neves e o ensino médio na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau Anísio José Moreira, na cidade de Mirassol. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, em 2006. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP, trabalhando com pesquisa na área de Parasitologia Veterinária, com Helmintologia em Animais Silvestres. 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 agosto de 2007, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado. Atualmente ocupa o cargo de Assistente Agropecuário I, na Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

## DEDICATÓRIA

Aos animais de Porto Primavera e a todos os pesquisadores e técnicos que trabalharam por eles.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos valiosos ensinamentos de cada dia;

A minha família, base de tudo, que sustenta e se realiza com cada conquista;

A Professora Rosangela Zacarias Machado, minha orientadora, pelo exemplo de força e dedicação profissional, e pela paciência e amizade constantes; muito obrigada pela preciosa oportunidade de crescimento profissional e pessoal, em nossa convivência;

Ao Professor José Maurício Barbanti Duarte, espírito forte e inovador, pelo exemplo de dedicação e competência profissional; muito obrigada pela valiosa contribuição em nosso trabalho, pela atenção, paciência e amizade constantes;

Aos professores membros da Banca de Qualificação e de Defesa: Profa. Dra. Karin Werther, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e Prof. Natalino Yoshinari, pelo auxílio na correção deste trabalho e sugestões pertinentes ao contexto da discussão;

Ao Professor Jonh Stephen Dumler, pela atenção, paciência e considerações pertinentes em nossa pesquisa;

Aos amigos presentes e aqueles que já passaram pelo Departamento de Patologia Veterinária e Laboratório de Imunoparasitologia (funcionários, professores, estagiários e pós-graduandos): obrigada pela boa convivência e pela contribuição, cada um a seu modo, para a realização de nosso trabalho; agradecimento especial ao querido amigo Marcos Rogério André, pelos ensinamentos, pela paciência, bondade, dedicação e amizade, de todos os dias;

Aos amigos Andréa Higa Nakaghi, Meire Cristina Seki, Elias A. Gutierrez Carnelossi, pela contribuição nos processos de clonagem, análise estatística e construção de árvores filogenéticas, respectivamente;

A todos os amigos de jornada, pelo apoio e amizade constantes; obrigada minha querida e leal Michele C. de Camargo Oliveira, muito obrigada por tudo;

Aos demais professores e funcionários deste campus, pela boa convivência e pela enorme contribuição em minha formação profissional;

As funcionárias da Pós-Graduação em Medicina Veterinária e da Biblioteca deste campus pela atenção, educação e auxílio sempre que necessário.

A Fapesp, pela bolsa concedida e suporte financeiro ao projeto.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	01
II. OBJETIVOS	
Objetivo geral.....	08
III. MATERIAL E MÉTODOS	
1. Região fisiográfica.....	08
2. Animais.....	09
3. Colheita de sangue, preparo e acondicionamento das amostras.....	10
4. Técnicas Diretas e Indiretas de detecção dos agentes	
4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	13
4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	
4.2.1 Extração de DNA.....	14
4.2.2 Amplificação de DNA dos gêneros <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> e <i>Neorickettsia</i> .....	14
4.2.3 Amplificação do DNA das espécies <i>E. chaffeensis</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. ewingii</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>N. risticii</i> .....	15
5. Clonagem e seqüenciamento	
5.1 Extração de amplicons da PCR.....	18
5.2 Quantificação de DNA dos ampímeros.....	18
5.3 Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy.....	19
5.4 Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	20
5.5 Mini-preparação de DNA Plasmidial (Método da Lise Alcalina).....	20



5.6 Análise dos clones recombinantes e amostras purificadas da PCR	
5.6.1 Seqüenciamento.....	21
5.6.2 Análise das Seqüências.....	22
6. Enzimas de restrição.....	23
7. Construção de Árvore Filogenética.....	23
8. Análise estatística .....	24
IV) RESULTADOS	
1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	
1.1 Sorologia para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....	24
1.2 Sorologia para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	25
2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	
2.1 Nested PCR para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. ewingii</i> , <i>Anaplasma marginale</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>Neorickettsia risticii</i> .....	27
3. Demonstração de Dendogramas Filogenéticos das seqüências obtidas dos amplicómeros com alinhamento múltiplo pelo CLUSTAL-W e Mega-4.....	33
4. Enzimas de restrição.....	35
5. Análise estatística.....	35
V. DISCUSSÃO .....	36
VI. CONCLUSÕES.....	44
VII. REFERÊNCIAS.....	45

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos de agentes da família Anaplasmataceae, tamanho dos amplicons e referência de cada protocolo.....	16
Tabela 2. Reação e seqüências térmicas para cada agente da família Anaplasmataceae pesquisado.....	17
Tabela 3. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de <i>E. chaffeensis</i> , Reação de Imunofluorescência Indireta.....	25
Tabela 4. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de <i>A. phagocytophilum</i> , Reação de Imunofluorescência Indireta.....	26
Tabela 5. Resultados da nested PCR para <i>E. chaffeensis</i> e para o genogrupo de <i>A. phagocytophilum</i> de acordo com a área e momento de captura dos cervos-do-pantanal.....	29
Tabela 6. Co-soropositividade e co-soronegatividade de cervos-do-pantanal testados pela RIFI para os antígenos de <i>E. chaffeensis</i> e <i>A. phagocytophilum</i> .....	31
Tabela 7. Co-positividade e co-negatividade de cervos-do-pantanal testados pela PCR para <i>E. chaffeensis</i> e para <i>A. phagocytophilum</i> .....	31
Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos na RIFI e na PCR para <i>E. chaffeensis</i> nos testes com amostras de cervos-do-pantanal.....	32
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos na RIFI e na PCR para <i>A. phagocytophilum</i> nos testes com amostras de cervos-do-pantanal.....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa esquemático evidenciando a área de estudo e os locais de captura das sub-populações de cervos-do-pantanal.....	12
Figura 2. Reação de Imunofluorescência Indireta, controles negativo e positivo (soro de cervo) para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....	14
Figura 3. Mapa do vetor de clonagem pgem-t easy (Promega®).....	19
Figura 4. Sororeatividade de cervos-do-pantanal ao antígeno de <i>E. chaffeensis</i> , reação de imunofluorescência indireta.....	25
Figura 5. Sororeatividade de cervos-do-pantanal ao antígeno de <i>A. phagocytophilum</i> , reação de imunofluorescência indireta.....	26
Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio, evidenciando bandas de amplicómeros de animais positivos pela nested pcr para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....	28
Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio, evidenciando bandas de amplicómeros de animais positivos pela nested PCR para genótipo de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	29
Figura 8. Gráfico demonstrando a porcentagem de cervos-do-pantanal soros-reagentes aos antígenos de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em quatro sub-populações (ms01, px, ms02, agua), utilizando-se a reação de imunofluorescência indireta (rifi).....	30
Figura 9. Gráfico demonstrando a porcentagem de cervos-do-pantanal em que detectou-se DNA de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> e de <i>Anaplasma spp.</i> , em quatro sub-populações (ms01, px, ms02 e agua), utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	30

- Figura 10. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Anaplasma* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cervos do pantanal naturalmente infectados (Amostras *Anaplasma* spp. Deer 1F, Cont2, Cont3, Cont4 e 5F).....33
- Figura 11. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Ehrlichia* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cervos do pantanal naturalmente infectados (Amostras *Ehrlichia chaffeensis* Deer 201, Deer 207 e Deers D1 D4).....34
- Figura 12. Dendograma Filogenético exibindo a amostra positiva para o gênero *Ehrlichia* obtidas com seqüências parciais do gene *dsb* (5'- 3') de amostras de sangue de cervos do pantanal naturalmente infectados (Amostra MD *Ehrlichia chaffeensis* 92 88729.b).....34

**IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE AGENTES RICKETTSIAIS  
(RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE) EM CERVO-DO-PANTANAL  
(*Blastocerus dichotomus*), UTILIZANDO MÉTODOS SOROLÓGICO E  
MOLECULAR**

**RESUMO** - O presente trabalho teve por objetivo pesquisar no sangue de cervos-do-pantanal (*B. dichotomus*), a presença de DNA de agentes rickettsiais, tais como *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale* e *Neorickettsia risticii*, pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), além de estudar a prevalência de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e anti-*A. phagocytophilum* utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os 143 animais utilizados foram capturados durante o desenvolvimento do Projeto Cervo-do-Pantanal (1998 a 2002) na área de inundação da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, no Rio Paraná, e divididos em quatro sub-populações de acordo com o local e momento da captura, em áreas denominadas MS01, MS02 (Mato Grosso do Sul, antes e após a inundação, respectivamente), PX (Rio do Peixe, depois da primeira cota de inundação) e AGUA (Rio Aguapeí, depois da inundação). Na avaliação sorológica, as freqüências de animais positivos para anticorpos anti-*E. chaffeensis* e anti-*A. phagocytophilum* foram de 76,76% e 20,20% em MS01, 88,88% e 22,22% em PX, 88,88% e 5,55% em MS02, e 94,12% e 5,88% em AGUA, respectivamente. Na pesquisa de DNA, dos 143 animais testados, 61 (42,65%) foram positivos para *E. chaffeensis*, sendo 38 (38,38%) de MS01, 4 (44,44%) de PX, 12 de MS02 (66,66%) e 7 (41,18%) de AGUA. Amostras positivas enviadas para seqüenciamento revelaram 100% de similaridade com amostras de *Ehrlichia chaffeensis* da Argentina e dos Estados Unidos (números de acesso no Genbank EU826516.2 e AF416764.1, respectivamente). Já para o genogrupo de *A. phagocytophilum*, 70 cervos (48,95%) foram considerados positivos. Destes, 51 (51,51%) são provenientes de MS01, 12 (66,66%) de MS02 e 7 (41,18%) de AGUA. Animais provenientes de PX foram todos negativos. Amostras positivas enviadas para seqüenciamento

mostraram 99% de similaridade com uma amostra de *Anaplasma* spp. proveniente do intestino delgado de mosquitos do gênero *Anopheles* (número de acesso no Genbank AY837739.1), bem como com amostras de *A. platys* (número de acesso no Genbank EU439943.1). Com relação a PCR para *A. marginale*, obteve-se a formação de bandas inespecíficas e resultados conclusivos não foram alcançados. No seqüenciamento, a análise não revelou similaridades com amostras de *A. marginale*. No que se refere a PCR para *E. canis*, também houve formação de bandas inespecíficas, de diferentes tamanhos, na grande maioria das amostras, sendo estas consideradas negativas, uma vez que o seqüenciamento também não revelou similaridades. Quanto aos animais testados para *E. ewingii* e *N. risticii*, todos apresentaram-se negativos.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia* sp, *Anaplasma* sp., *Neorickettsia* sp., cervo-do-pantanal, sorologia, PCR.

**IDENTIFICATION AND PREVALENCE OF RICKETTSIAL AGENTS  
(RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE) IN MARSH DEER (*Blatocerus  
dichotomus*), USING SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS**

**SUMMARY** – The present work had as objective to research in the blood of marsh deer (*B. dichotomus*), the presence of rickettsial agents DNA such as *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale* e *Neorickettsia risticii*, by the Polimerase Chain Reaction (PCR), as well as studying the prevalence of anti-*E. chaffeensis* and anti-*A. phagocytophilum* antibodies using Indirect Immunofluorescence Reaction (IFA). The 143 animals that were used were captured during the development of the Marsh Deer Project (1998 to 2002) in the flood area of the Porto Primavera Hydroelectric Power Station, in Parana River, and divided in four sub-populations according to the local and moment of the capture, in areas denominated MS01, MS02 (Mato Grosso do Sul, before and after flood respectively), PX (Peixe's River, after the first flood quota) and AGUA (Aguapeí River, after flood). In the serological avaliation, the frequency of positive animals for anti-*E. chaffeensis* and anti-*A. phagocytophilum* antibodies were 76,76% and 20,20% in MS01, 88,88% and 22,22% in PX, 88,88% and 5,55% in MS02, and 94,12% and 5,88% in AGUA, respectively. In the DNA research, from the 143 tested animals, 61 (42,65%) were positive for *E. chaffeensis*, 38 (38,38%) from MS01, 4 (44,44%) from PX, 12 from MS02 (66,66% and 7 (41,18%) from AGUA. Positive samples send to sequency demonstrate 100% of similarity with samples of *Ehrlichia chaffeensis* from Argentina and United States (numbers of access in Genbank EU826516.2 and AF416764.1, respectively). For the *A. phagocytophilum* genogroup, 70 deers (48,95%) were considered positive. Of these, 51 (51,51%) come from MS01, 12 (66,66%) from MS02 and 7 (41,18%) from AGUA. The animals that come from PX were all negative. Positive samples send to sequencing demonstrated 99% of similarity with a sample of *Anaplasma* spp. which came from small intestine of mosquitos of the Anopheles gender (number of access in Genbank AY837739.1), as well as samples of *A. platys*

(number of access in Genbank EU439943.1). Regarding PCR for *A. marginale*, it was obtained the formation of inespecific bands and conclusive results were not reached. In the sequency, the analysis didn't reveal similarities with samples of *A. marginale*. In what refers to PCR to *E. canis*, there was also formation of inespecific bands, of different sizes, in the great majority of samples, being these considered negative once the sequencing also didn't reveal similarities. About the tested animals for *E. ewingii* and *N. Risticii*, they were all negative.

**Keywords:** *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Neorickettsia* sp., Marsh Deer, serology, PCR.



## I) INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos séculos, o ambiente terrestre tem sofrido uma série de alterações, evidenciadas nas novas relações parasita-hospedeiro, na perda de fontes tradicionais de alimento, no reconhecimento e introdução de novos patógenos e toxinas, bem como na presença de novas formas de estresse devido às mudanças no padrão de uso da terra e outras atividades humanas (MUNSON & KARESH, 2002).

Embora os impactos das atividades humanas tenham ocorrido em todos os ecossistemas, seus efeitos são maiores sobre animais terrestres, uma vez que estes competem diretamente com o homem por habitat. Assim, a composição genética de muitas espécies sofreu alterações, sobretudo por meio de ações humanas que reduziram o tamanho das populações ou limitaram o fluxo de genes entre elas. Juntas, essas modificações genéticas e ambientais têm o potencial de transformarem drasticamente a ecologia das doenças no ecossistema terrestre e a saúde global das populações humana e de vida selvagem (MUNSON & KARESH, 2002).

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), o maior cervídeo brasileiro (DUARTE, 1996), é uma espécie que luta pela sobrevivência em um hábitat onde os maiores impactos são observados, as regiões mais baixas, a várzea. Atualmente, a distribuição da espécie encontra-se bastante reduzida e fragmentada (PINDER & SEAL, 1995), colocando o cervo-do-pantanal como uma das espécies brasileiras ameaçadas de extinção (BERNARDES et al, 1990). No Estado de São Paulo especificamente, a última população significativa da espécie ocupava as várzeas do rio Paraná entre as barragens de Jupia e Porto Primavera (SCHALLER & VASCONCELOS, 1978), área inundada em 1998 com a entrada desta hidrelétrica em operação. Em geral, os reservatórios de grandes usinas hidrelétricas eliminam os ambientes de várzeas onde vive o cervo-do-pantanal, praticamente anulando qualquer possibilidade de sobrevivência e sustentabilidade dessas populações em longo prazo (CHARITY et al, 1989).

Além do impacto das hidrelétricas, a acentuada retração na área de ocorrência original da espécie deve-se a múltiplos e complexos fatores, dentre eles a alteração e

eliminação de habitat devido ao avanço das fronteiras agrícolas e urbanas, induzindo a ocorrência de doenças introduzidas por bovinos domésticos, alterações na relação parasita hospedeiro e atividades predatórias de caça (PINDER & SEAL, 1995; WEMMER, 1998).

Nesse contexto, membros da família Anaplasmataceae emergem como importantes patógenos representados por organismos bacterianos gram negativos e intracelulares obrigatórios que infectam seres humanos e animais, apresentando como vetores principais os carrapatos (INOKUMA et al., 2001). Em 2001, uma reorganização dos membros pertencentes à Ordem Rickettsiales foi proposta por DUMLER et al., com os gêneros *Rickettsia* e *Orientia* pertencendo à família Rickettsiaceae, e os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, à família Anaplasmataceae.

Microorganismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* são mantidos na natureza por meio de um ciclo enzoótico entre animais selvagens e carrapatos, podendo infectar seres humanos e animais domésticos, sobretudo quando o equilíbrio ambiental é alterado (RIKIHISA, 2003).

No que se refere ao gênero *Anaplasma*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum* são freqüentemente relatados, mas apenas ruminantes, sobretudo cervídeos e bóvidos, são citados como hospedeiros susceptíveis para *A. marginale* (KUTLER, 1994). Para este último, MARTINEZ et al. (1999) relata, no México, soroprevalência de 69% em veado-de-cauda-branca (*O. virginianus*). Já *A. phagocytophilum*, que apresenta potencial zoonótico, infecta várias espécies animais, tais como ruminantes, cães, cavalos e pequenos roedores (DUMLER et al., 2001).

Quanto ao gênero *Ehrlichia*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, além de serem identificadas em alguns animais selvagens e carrapatos ixodídeos (LOCKHART et al., 1997; ANDERSON et al., 1993; YABSLEY et al., 2002), são relatadas nas Américas como causa de doença humana (DAWSON et al., 1991; BULLER et al., 1999; GONGORA-BIANCHI et al., 1999; RIPOLL et al., 1999; DUMLER et al., 2001; GOODMAN et al., 2003). Evidências imunoserológicas da exposição à *E. chaffeensis*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* foram relatadas no Brasil e na Venezuela (ARRAGA-ALVARADO et al., 1996; GALVÃO et al., 2002; CALICI et al., 2004). No Brasil,

anticorpos para *E. chaffeensis* e DNA de *E. ewingii* foram detectados em cães no Estado de Minas Gerais (GALVÃO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008), onde casos suspeitos de erliquiose monocítica humana foram recentemente relatados (CALICI et al., 2004; COSTA et al. 2005; COSTA et al., 2006). Na Venezuela, PEREZ et al. (2006), utilizando PCR, relatam a ocorrência de infecção humana por *E. canis*. Vale ressaltar que as técnicas de detecção de anticorpos anti-erliquiais não são específicas e, apenas por técnicas moleculares, a detecção específica de cada agente pode ser alcançada.

Infecções humanas por organismos da família Anaplasmataceae foram primeiramente reconhecidos em 1953, com espécie atualmente conhecida como *Neorickettsia sennetsu*. Em 1986, foi reconhecida a infecção causada por *Ehrlichia chaffeensis* e, em 1990, por *Anaplasma phagocytophilum*. *Ehrlichia ewingii* foi, em 1998, reconhecida como causa de doença humana (DUMLER et al., 2007).

Desde o primeiro reconhecimento e implementação de métodos de diagnóstico para a infecção humana por *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, a incidência das enfermidades tem aumentado linearmente. No entanto, testes diagnósticos e epidemiológicos indicam que as infecções causadas por membros da referida família estão distribuídas globalmente e sugerem que outros agentes da “erliquiose” animal e humana serão identificados. Com o aumento da detecção das enfermidades, constatou-se que as mesmas podem ser severas, com aproximadamente metade dos pacientes requerendo hospitalização por complicações incluindo dificuldade respiratória, miocardite, complicações neurológicas, hepatite, choque séptico ou tóxico, infecções oportunistas, e morte em 0,5 a 3,0%. Por esse motivo, principalmente, o estudo mais aprofundado dessas doenças, incluindo a identificação de vetores, reservatórios e fatores de risco, torna-se imprescindível (DUMLER, 2005).

Nos EUA, o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) é considerado reservatório natural de *E. chaffeensis*, sendo o mais importante hospedeiro das formas adulta e imatura de *Amblyomma americanum* (LOCKHART et al., 1997). DAWSON et al. (1994a) demonstraram, por meio de infecção experimental, que *E. chaffeensis* circula no sangue periférico dos veados por pelo menos duas semanas, sendo que os animais não apresentam evidência de doença clínica. Os veados podem se infectar

com várias espécies pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, o que resulta em potenciais reações cruzadas nos diferentes testes sorológicos específicos (UNVER et al., 1999). DAWSON et al. (1994b) relatam soroprevalência de 43% para *Ehrlichia spp.*, utilizando RIFI, em 1269 veados-de-cauda-branca testados em vários estados norte-americanos, o que indica que os animais estão naturalmente infectados com o agente. ARENS et al. (2003) relatam uma prevalência nesses animais de 23%, 20% e 99% para *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *Anaplasma spp*, respectivamente, por meio da utilização de PCR. Já na sorologia, constatou-se uma alta prevalência de anticorpos para *E. chaffeensis* (87%) e baixa prevalência de anticorpos para *A. phagocytophilum* (2%). Em 1998, FOLEY et al. utilizando PCR para *Ehrlichia spp.* com base no gene 16S, encontraram uma prevalência de 38% em 21 *Odocoileus hemionus hemionus* e *O. hemionus columbianus* testados, sendo todos soronegativos para *Anaplasma phagocytophilum*. YABSLEY et al. (2002) relatam que, de 110 veados-de-cauda-branca (*O. virginianus*) testados por meio de PCR para *E. ewingii*, 6 (5,5%) foram positivos, sugerindo que o hospedeiro pode atuar também como reservatório desse agente. Já em pesquisa realizada por YABSLEY et al. (2005) envolvendo *Odocoileus hemionus* do Arizona, foi constatado que, dos 125 animais testados, 29 (23%) e 11 (9%) tinham anticorpos reativos para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, respectivamente, utilizando-se a reação de imunofluorescência indireta.

O DNA de *E. chaffeensis* foi encontrado ainda em 71% dos coiotes (*Canis latrans*) dentre 21 animais examinados, o que sugere que essa bactéria comumente infecta coiotes de vida livre em Oklahoma, EUA (KOCAN et al., 2000). Nesse mesmo Estado norte-americano, MURPHY et al. (1998), em pesquisa molecular e sorológica realizada em 65 cães, relatam que 15,4% dos animais examinados eram positivos para *Ehrlichia spp.* na PCR, sendo 6,2% positivos para *E. ewingii*, 3,1% para *E. canis* e 6,2% para *E. chaffeensis*, enquanto 10,8% foram soropositivos para *E. canis* ou *E. chaffeensis*. Já LAPPIN et al. (2006) descrevem que o DNA de *A. phagocytophilum* foi detectado no sangue de gatos clinicamente doentes, enquanto em pesquisa realizada com coelhos selvagens norte-americanos, relata-se que 27% dos animais

apresentavam evidências de infecção ativa e 66% foram soropositivos para o mesmo agente (GOETHERT & TELFORD, 2003).

Cabras, cães, raposas vermelhas, guaxinins, gambás e roedores podem também servir como hospedeiros para todos os estágios de *Amblyomma americanum* (PADDOCK & CHILDS, 2003), o que sugere que eles podem estar envolvidos na manutenção natural de *E. chaffeensis*. No entanto, o material genético (DNA) de *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* tem sido detectados em outras espécies de carrapatos nos EUA, tais como *Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* (STEIERT & GILFOY, 2002; HOLDEN et al., 2003; STEINER et al., 2006; YABSLEY, 2009).

Ainda nos EUA, DUGAN et al. (2005) pesquisaram, no soro de guaxinins (*Procyon lotor*) e gambás (*Didelphis virginianus*), evidências de infecção por *E. chaffeensis*, *E. canis* e *A. phagocytophilum*, sendo que 38,3% dos guaxinins apresentaram anticorpos reativos para *E. chaffeensis*, 21,7% para *E. canis* e 1,7 % para *A. phagocytophilum*; os gambás foram negativos na RIFI. Além dos guaxinins (*P. lotor*), o roedor *Peromyscus leucopus* e o esquilo cinzento (*Sciurus carolinensis*) são citados como competentes reservatórios de *A. phagocytophilum* (LEVIN et al., 2002). No que se refere à infecção natural por *E. chaffeensis*, WILLIAMS et al. (2002) descrevem a ocorrência de erliquiose em lêmures (*Lemur catta* e *Varecia variegata*) clinicamente enfermos, nos quais o agente foi detectado por meio de PCR em amostras de sangue periférico. Também envolvendo esses primatas (*Lemur catta*, *Varecia variegata*, além de *Eulemur macaco flavifrons*), YABSLEY et al. (2004) conduziram um estudo no qual foi demonstrado que 38,5% e 30,8% dos lêmures adultos pesquisados (total de 56 animais) apresentavam anticorpos reativos para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, respectivamente.

Na Europa e em alguns países asiáticos, vários estudos estão sendo conduzidos para avaliar a prevalência dos agentes da erliquiose granulocítica e monocítica humana em animais selvagens e vetores da infecção.

A respeito da ocorrência das enfermidades, verifica-se diferenças pronunciadas entre os países europeus, bem como marcada variabilidade entre as localidades

(STRLE, 2004). *Ixodes ricinus* é considerado o principal vetor de *A. phagocytophilum* (RYMASZEWSKA & ADAMSKA, 2004; FERQUEL et al., 2006), sendo descritos como hospedeiros desse agente o cabrito montês (*Capreolus capreolus*), alce (*Alces alces*), cervo vermelho (*Cervus elaphus*) e os roedores *Apodemus flavicollis* e *Clethrionomys glareolus* (RIZZOLI et al., 2004; SKARPHÉDINSSON et al., 2005; STUEN et al., 2006).

No continente asiático, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* são descritos infectando roedores na China e na Coréia, sendo *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor silvarum* e *Haemaphysalis* spp. considerados vetores desses agentes (CAO et al., 2006; WEN et al., 2003; KIM et al., 2006).

No Brasil, SZABÓ et al. (2003) descrevem o parasitismo por *Boophilus microplus*, *Amblyomma triste*, *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, em cervos-do-Pantanal (*B. dichotomus*) provenientes da área de inundação da hidrelétrica de Porto Primavera, no rio Paraná. Na região inundada, demonstrou-se que 100% dos cervos capturados, que habitavam a margem esquerda do rio Paraná, onde a várzea é mais estreita, estavam parasitados por *Boophilus microplus* e as infestações eram mais intensas. Por outro lado, na margem direita do rio Paraná, no Estado de Mato Grosso do Sul, as várzeas possuíam de 5 a 10 Km de largura, diminuindo o contato dos cervos com bovinos, resultando em uma infestação bem menor. Em amostras de sangue desses mesmos animais, MACHADO et al. (2006) detectaram a presença do DNA de *E. chaffeensis* e *A. marginale*, sendo ainda necessário determinar qual(is) espécie de carrapato realmente está envolvida na transmissão das bactérias entre os animais. A utilização de métodos moleculares se faz necessária uma vez que *E. chaffeensis* pode potencialmente apresentar reação sorológica cruzada com *E. canis* e *E. ewingii* (BULLER et al., 1999; UNVER et al., 1999), sendo importante determinar, especificamente, quais membros da família Anaplasmataceae estão presentes nos cervos e podem realmente infectar animais selvagens, domésticos e humanos no Brasil.

Em relação à febre de Potomac, sabe-se que é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela *Neorickettsia risticii*, sendo que pouco é conhecido sobre sua prevalência e transmissão natural. É sugerido que, pela proximidade filogenética com

*N. helminthoteca* e *N. sennetsu*, *N. risticii* também apresenta padrão de transmissão envolvendo a ingestão de trematódeos aquáticos e caramujos (PUSTERLA et al., 2000; DUMLER et al., 2001) . Nos EUA, há relatos de detecção do DNA de *N. risticii* em morcegos e pássaros insetívoros, parasitados por trematódeos (PUSTERLA et al., 2003; GIBSON et al., 2005). No Brasil, são descritas infecções por *N. helminthoteca* e *N. risticii*, em cães e cavalos, respectivamente (HEADLEY et al., 2004; HEADLEY et al., 2006; COIMBRA et al., 2006), detectando-se, inclusive, o DNA dos agentes. No Estado do Rio Grande do Sul, COIMBRA et al (2003) identificaram caramujos do gênero *Heleobia* albergando cercárias como portadores de *N. risticii*.

Atualmente, as infecções animais e humanas por Anaplasmataceae estão sendo reconhecidas como importantes e potencialmente fatais enfermidades transmitidas por artrópodes. Segundo SZABÓ et al. (2003), a instalação de usinas hidrelétricas, por exemplo, reduz o habitat de muitas espécies, especialmente aquelas que vivem nas áreas pantanosas, o que afeta a vida selvagem em vários aspectos. Conseqüentemente, as mudanças na ecologia de vetores e hospedeiros poderiam expor as populações humanas e de animais domésticos às doenças rickettsiais, sobretudo em áreas de recreação e de atividades agropecuárias que facilitam um maior contato com animais selvagens e seu ambiente. A detecção do DNA de *E. chaffeensis* e *A. marginale* em amostras de sangue dos cervos presentes na área referida (MACHADO et al., 2006), já constitui um sinal de alerta, demonstrando a necessidade de maiores avaliações epidemiológicas de animais silvestres da fauna brasileira no que se refere às infecções erliquiais, as quais poderão vir a ser de grande importância para a Saúde Pública nos próximos anos.

Além disso, o conhecimento acerca da ecologia das enfermidades em animais de vida livre permite um melhor delineamento das estratégias de conservação das espécies, seja em programas de translocação ou reintrodução de animais seja na manutenção dos mesmos em cativeiro (SZABÓ et al., 2003).

Este trabalho objetivou avaliar amostras de sangue de cervos-do-pantanal (*B. dichotomus*) para evidenciar a presença de agentes da família Anaplasmataceae nestes animais no Brasil.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo pesquisar no sangue de cervos-do-pantanal (*B. dichotomus*) a presença de DNA de agentes rickettsiais, tais como *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale* e *Neorickettsia risticii*, pela PCR, além de estudar a prevalência de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e anti-*A. phagocytophilum* utilizando-se a RIFI.

## III. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Região Fisiográfica

Na região de instalação da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, no Rio Paraná (entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul), foram estabelecidas várias bases de campo do Projeto Cervídeos Brasileiros, com o compromisso de estudar e monitorar os cervos (*B. dichotomus*) da área, além de reunir dados para a análise dos impactos oriundos do enchimento do reservatório (TRAVASSOS, 2001).

A região em questão apresenta clima tropical com verão úmido e inverno seco registrando temperaturas máximas de 40°C e mínimas de 10°C, com pluviosidade média anual de 1200 mm a 1400 mm e umidade relativa do ar de aproximadamente 80%. Assim, o cenário é de uma enorme bacia de alagamento, compondo os denominados “varjões”, áreas de importante valor ecológico das terras alagáveis da Bacia do Rio Paraná (TRAVASSOS, 2001). As várzeas ou planícies de inundação são formadas em rios geralmente largos e constituem a forma mais comum de sedimentação fluvial. Na área referida, os varjões abrangem municípios do Mato Grosso do Sul como Quebracho, Bataguassú e Brasilândia e ainda municípios do Estado de São Paulo como Presidente Epitácio, Caiuá, Panorama, Paulicéia, São João do Pau D’Alho, Nova Independência e Castilho (DUARTE et al, 2003).



O potencial turístico da região é amplamente explorado às margens do Rio Paraná, principalmente por meio da Prefeitura da Estância Turística de Presidente Epitácio, que promove eventos como o Festival Nacional da Pesca e diversos torneios de esportes aquáticos (TRAVASSOS, 2001).

## **2. Animais**

No presente estudo, foram utilizadas 143 amostras de sangue de animais capturados durante o desenvolvimento do Projeto Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera. Este foi desenvolvido entre os anos de 1998 e 2002 por um numeroso grupo de pesquisadores, com financiamento integral da CESP (Companhia Energética de São Paulo). As capturas foram realizadas segundo metodologia descrita por DUARTE (2008) e ocorreram na região de alagamento da usina, compreendendo as áreas de várzea e mata ciliar adjacentes ao Rio Paraná e de seus afluentes como o Rio do Peixe, Rio Verde e Rio Aguapeí.

A contenção química dos cervos seguiu os padrões adotados por NUNES et al. (2001). Cada animal recebeu um número e as coordenadas do local de captura foram estabelecidas com auxílio de GPS. Para o presente estudo, os animais (n =143) foram divididos em quatro grupos, de acordo com o local e momento de captura:

- Região entre o vilarejo de Quebracho e Bataguassú: a região em questão é formada pelas várzeas marginais do próprio Rio Paraná e, portanto, foi a região que sofreu o maior impacto pela formação do lago da UHE “Sergio Motta”. Praticamente 90 % das áreas de várzea foram tomadas pela água, na cota 257, restando nesta região pequenas lagoas sazonais, abastecidas pelas águas da chuva e córregos que cortam a região, distribuindo-se em vários fragmentos de várzea ao longo das margens do rio Paraná, sendo praticamente inexistentes as matas ciliares na área. Para esta área foram caracterizados dois momentos distintos: a) antes da primeira cota de inundação da hidrelétrica, sendo denominado MS01 (99 animais) e b) dois anos após a primeira cota de enchimento, denominado MS02 (18 animais) (Figura 1) (LEMES et al., 2003; ANDRIOLO et al., 2001).

- Região do Rio do Peixe: o Rio do Peixe é um dos principais afluentes da margem esquerda do rio Paraná, já na primeira cota de enchimento do reservatório da UHE “Sergio Motta” constatou-se um impacto considerável, com perda de habitat para o cervo-do-pantanal. A região era formada por um riquíssimo mosaico de espécies vegetais de pequeno e médio porte e por relevantes áreas de mata. Nessa região, denominada PX, a população estudada refere-se àquela da primeira cota de inundação (nove animais), cota 253 m (primeira cota de inundação), entre Novembro de 1998 e Dezembro de 2000, quando houve um impacto de intensidade mediana (Figura 1) (PIOVEZAN et al., 2001).

- Região do Rio Aguapeí: O Rio Aguapeí, afluente da margem esquerda do rio Paraná é um rio muito sinuoso, apresentando uma importante população de cervos-do-pantanal. A região é formada por um rico mosaico vegetativo, mesclando plantas de cerrado e mata atlântica. Este refúgio de vida silvestre abriga uma densidade de cervos-do-pantanal em torno de 0,0043 ind/há (ANDRIOLO et al., 2001), o que resulta em uma subpopulação de aproximadamente  $55 \pm 15$  indivíduos. Nessa área, denominada AGUA, os animais foram capturados dois anos após a primeira cota de inundação (17 animais). As áreas de várzea do rio Aguapeí não sofreram impacto pela última cota de enchimento da UHE “Sergio Motta”, portanto foi uma área classificada como de baixo impacto e denominada AGUA. O monitoramento na região foi realizado entre Abril de 2001 e Novembro de 2002 (Figura 1) (LEMES et al., 2003).

### **3. Colheita de sangue, preparo e acondicionamento das amostras**

De cada animal anestesiado, foi procedida a colheita de sangue da veia jugular, utilizando-se vacutainers com anticoagulante e sem anticoagulante. Após a colheita, o material foi refrigerado até a chegada no laboratório de campo, sendo que as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas (10 minutos, a 1500 XG) para a separação do soro sangüíneo. O soro foi então dividido em tubos de 1,5 ml e, desta forma, congelado a -20°C. O sangue colhido em tubos heparinizados foi centrifugado (10 minutos, 1500 XG), permitindo a separação, por meio de uma pipeta de Pasteur, de 1 ml do anel

leucocitário impuro (com hemáceas). O anel foi então depositado em um frasco contendo 4 ml de meio de congelamento e, após homogeneização, o material foi transferido para palhetas de congelamento de sêmen e mantido a 4°C durante quatro horas. Após esse período de estabilização, as palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) por 30 minutos, para posterior imersão e acondicionamento no botijão (-196°C) (DUARTE, 2001).

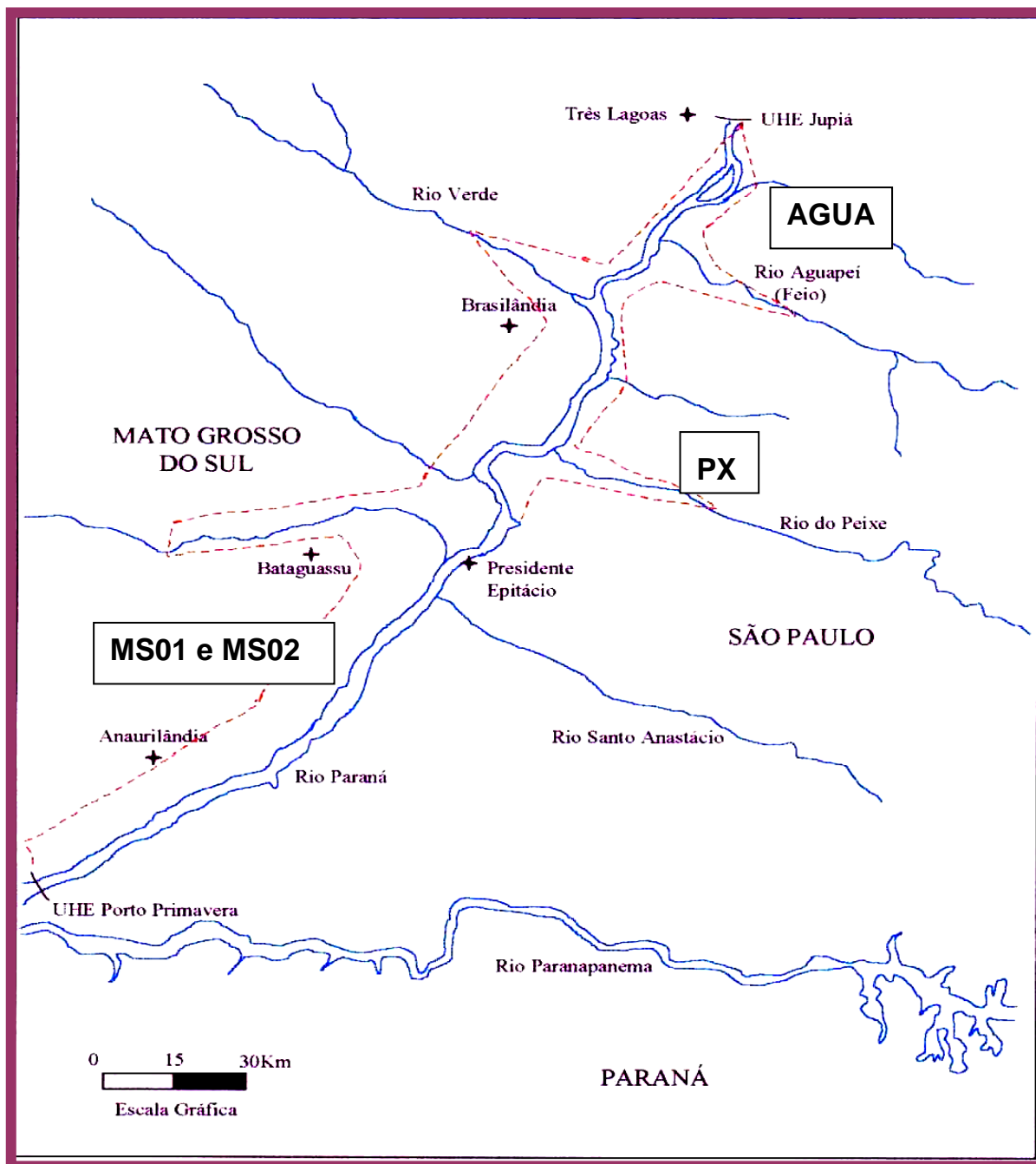


Figura 1. Mapa esquemático evidenciando a área de estudo e os locais de captura das sub-populações de cervos-do-pantanal (MS01, MS02, PX01 e AGUA), no período de 1998 a 2002.

#### 4. Técnicas Diretas e Indiretas de detecção dos agentes

Para a pesquisa do DNA dos agentes citados e determinação da frequência de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e anti-*A. phagocytophilum* foram utilizadas a PCR e o seqüenciamento das amostras, e a RIFI.

##### 4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foi realizada a diluição das amostras de soro a 1:40 em solução salina de fosfato tamponada (PBS pH 7,2). Dez µl do soro diluído foram depositados em cada poço das lâminas contendo substrato antigênico de *E. chaffeensis* (células DH82 contendo mórulas do agente) e , reservando-se dois poços para a adição das amostras de controle positivo e negativo. As lâminas foram incubadas a 37° C por 30 minutos em câmara úmida; em seguida, foram lavadas em PBS, secas e à cada pocinho foi adicionado 10 µl de conjugado (anti-IgG de veado, marcado pelo isoticianato de fluoresceína), diluído conforme orientação do fabricante (1:10). O material foi então novamente incubado (30 minutos a 37°C), em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, a lâmina foi montada em glicerina tamponada com bicarbonato (pH 9,5). As lâminas foram visualizadas em microscópio equipado com luz fluorescente para avaliação. Os mesmos procedimentos foram considerados para lâminas contendo substrato antigênico de *A. phagocytophilum* (células HL-60 contendo mórulas do agente). Foram considerados positivos soros que reagiram na diluição de  $\geq 1:40$ . A positividade da reação permitiu a observação de fluorescência nas mórulas, comparando-se com os controles positivo e negativo (Figura 2).

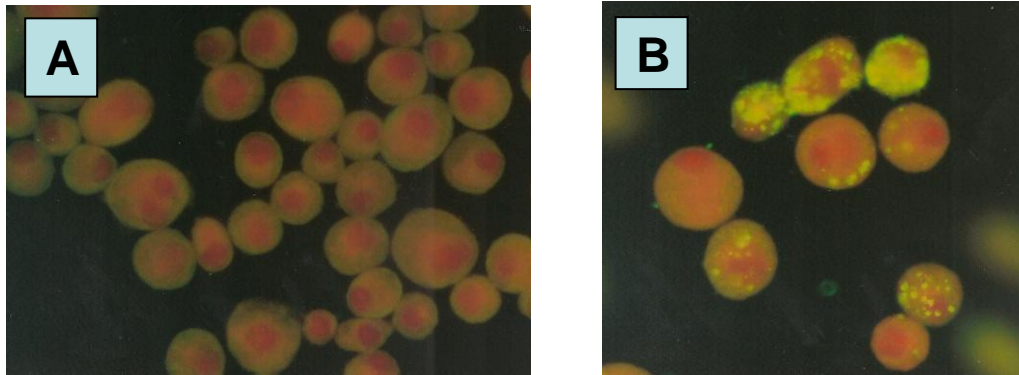


Figura 2. Reação de Imunofluorescência Indireta, controles negativo (A) e positivo (B) (soro de cervo) para *Ehrlichia chaffeensis*. Em A, não são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B, verifica-se presença de mórulas fluorescentes. Aumento de 400X.

## 4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

### 4.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de uma amostra de 200 µl de anel leucocitário e hemáceas (em meio de congelamento e armazenado em N<sub>2</sub> líquido, a -196°C) de 143 animais, usando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN<sup>TM</sup>), de acordo com as especificações do fabricante.

### 4.2.2 Amplificação de DNA dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR são baseados na seqüência parcial do gene 16SrRNA presente em todas as erlíquias e são apresentados na Tabela 1. A técnica da PCR foi realizada conforme DAWSON et al. (1994a), PERSING (1996), MURPHY et al (1998), KOCAN et al. (2000), MASSUNG et al. (1998), TORIONI et al. (1998) e CHAE et al. (2003) com algumas modificações. Cada amostra de DNA extraído (10 µl) foi usada em 50 µl da mistura contendo 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (com primers separados para *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E.*

*ewingii*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum* e *N. risticii*), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (2,0 U na reação de *A. marginale*), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100 nM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl) e água ultra pura estéril q.s.p. 50 µl. O Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub> -50 mM, Invitrogen®) foi utilizado na concentração de 1,5mM para todas as reações, exceto para a PCR de *N. risticii*, onde foi usado 2,5 mM. A seqüência térmica e tempo de amplificação para cada reação e para cada agente estão especificados na Tabela 2. Este processo foi realizado em aparelho termociclador modelo PTC-100™ – Peltier – Effect Cycling (MJ Research, Inc.).

A PCR simples para *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum* gene MSP2, segundo protocolos descritos por INOKUMA et al. (2001) e CASPERSEN et al. (2002), respectivamente, foi realizada na tentativa de esclarecer os resultados do seqüenciamento das amostras positivas na nested PCR para o genogrupo *A. phagocytophilum*. Também foi realizada PCR simples para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp., segundo AGUIAR et al, (2007), e as amostras positivas, enviadas ao seqüenciamento para verificação da positividade para *E. chaffeensis*.

#### **4.2.3 Amplificação do DNA das espécies *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum* e *N. risticii***

A reação de amplificação do tipo *nested* para cada agente referido foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (para gênero) como moldes para os primers (Tabela 1) para as próximas reações.

Para a reação da *nested*, utilizou-se as mesmas soluções da PCR, além de 1 µl da amostra de DNA amplificado e os primers espécie-específicos (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos de agentes da família Anaplasmataceae, tamanho dos amplicons e referência de cada protocolo.

Agentes rickettsiais	Seqüência dos primers	Tamanho do amplicono	Referência
<i>Ehrlichia spp</i>			
ECC	5'- aga acg aac gct ggc ggc aag cc - 3'	478	Dawson et al.(1994) Persing (1996) Murphy et al. (1998) Kocan et al. (2000)
ECB	5'- cgt att acc gcg gct gct ggc - 3'		
<i>E.chaffeensis</i> (16SrRNA)			
Chaff	5' - caa ttg ctt ata acc ttt tgg tta taa at-3'	410	Persing (1996) Kocan et al. (2000)
GA 1 UR	5' - gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
(dsb)			
dsb-330	5' -gat gat gtc tga aga tat gaa aca aat - 3'	409	Aguiar et al. (2007)
dsb-728	5'- ctg ctc gtc tat ttt act tct taa agt - 3'		
<i>E. canis</i> (16SrRNA)			
Can	5'- caa tta ttt ata gcc tct ggc tat agg a - 3'	358	Persing (1996)
GA1UR	5'- gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
<i>E. ewingii</i> (16SrRNA)			
8F	5'- agt ttg atc atg gct cag-3'	1440	Persing (1996)
1448R	5'- cca tgg cgt gac ggg cag tgt g-3'		
Ewingii	5'- caa ttc cta aat agt ctc tga cta tt-3'	412	
GA1UR	5'- gac ttt gcc ggg act tct tct-3'		
<i>A. marginale</i> (msp5)			
Ext F	5' - gca tag cct ccg cgt ctt tc - 3'	458	Torioni et al. (1998)
Ext R	5' - tcc tcg cct tgc ccc tca ga -3'		
Int F	5' - tac acg tgc cta ccg act ta - 3'	345	
<i>A. phagocytophilum</i> (16SrRNA)			
gE3a	5' - cac atg caa gtc gaa cgg att att c - 3'	932	Massung et al. (1998)
gE10R	5' - ttc cgt taa gaa gga tct aat ctc c - 3'	546	Massung et al. (2003)
gE2	5' - ggc agt att aaa agc agc tcc agg - 3'		
gE9F	5' - aac gga tta ttc ttt ata gct tgc t - 3'		
(MSP-2)			
MSP 465F	5' - tga tgt tgt tac tgg aca ga - 3'	550	Caspersen et al.(2002)
MSP 980R	5' - cac cta acc ttc ata aga a - 3'		
<i>Neorickettsia risticii</i> (16SrRNA)			
ER3-F	5'- att tga gag ttt gat cct gg -3'	599	Chae et al. (2003)
ER2-R	5'- gtt tta aat gca gtt ctt gg - 3'		
ER3a-F	5'- cta gcg gta ggc tta ac - 3'		
ER2a-R	5'- cac acc taa ctt acg gg -3'		
	5'- aag tcg aac gga ttt ttg tc - 3'	504	Inokuma et al. (2001)
	5'- ctt taa ctt acc gaa cc - 3'		



Tabela 2. Reação e seqüências térmicas para cada agente da família Anaplasmataceae pesquisado.

Reação/ Agente	Seqüência térmica
PCR (16SrRNA) <i>E. canis</i> e <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
nPCR (16SrRNA) <i>E. canis</i> e <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
PCR (dsb) <i>E. chaffeensis</i>	95°C por 2 minutos 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos
PCR (msp-2) <i>A. phagocytophilum</i>	94°C por 2 minutos 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos
PCR (16SrRNA) <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
Npcr <i>A. phagocytophilum</i>	94°C por 5 minutos 30 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
PCR (16SrRNA) <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
nPCR <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
PCR (16SrRNA) <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
nPCR <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
PCR (msp-5) <i>A. marginale</i>	94°C por 5 minutos 35 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 63°C, 3 minutos a 72°C 72°C por 10 minutos
n PCR <i>A. marginale</i>	95°C por 1 min. 35 ciclos: 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 65° e 2 minutos por 72°C. 72°C durante 10 minutos.
PCR (msp-2) <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

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,2% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µl/ml) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90V/50mA durante 90 minutos, fazendo-se uso de um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb ladder), bem como de controles positivo e negativo como parâmetros para melhor caracterização dos produtos amplificados. Os géis pós corrida foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um computador com programa de análise de imagens (Eagle-Eye II-Stratagene®).

## **5. Clonagem e Seqüenciamento**

### **5.1 Extração de amplicons da PCR**

Os produtos da nested PCR de *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum* foram cortados do gel de agarose, pesados e armazenados em tubos estéreis de 2,0 ml. Em seguida, foram extraídos e purificados com o Kit GeneClean II (Bioagency®), de acordo com as recomendações do fabricante, e enviados para o seqüenciamento. Para os produtos do genogrupo de *Anaplasma phagocytophilum*, além do processo de extração e purificação, foi realizada a clonagem dos fragmentos de DNA antes do seqüenciamento.

### **5.2 Quantificação de DNA dos amplímeros**

Cada amostra extraída do gel foi então submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 2,0%, corado com Brometo de Etídeo 0,01%, em cuba horizontal, com solução de TEB 1X pH 8,0 como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e trinta minutos a 50 mA e 100 V. Um marcador de peso molecular (“Low Mass DNA Ladder”) foi adicionado à primeira canaleta de cada

gel analisado para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras.

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

A clonagem dos produtos amplificados do genótipo de *A. phagocytophilum* foi realizada com o vetor pGEM-T Easy (Promega®) e as reações executadas conforme indicação do kit. As concentrações de DNA e vetor 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 a seguir:

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

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 foram misturadas e incubadas a 4°C “overnight” para obtenção do número máximo de transformantes. A Figura 3 mostra o desenho do vetor pGEM-T Easy.

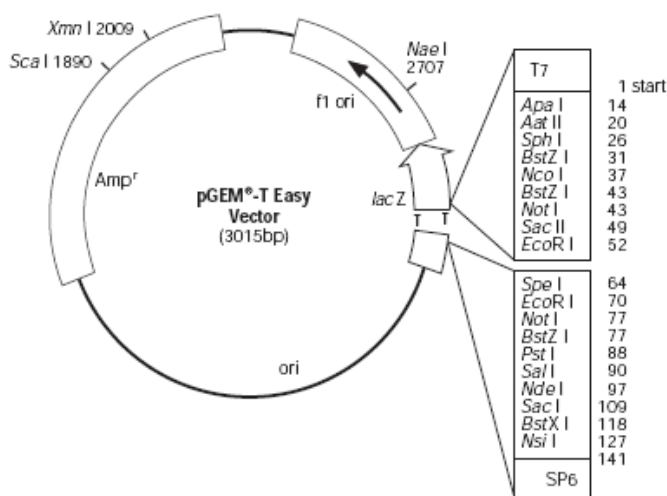


Figura 3. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®)

#### **5.4 Transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH10B**

O produto da ligação descrita anteriormente foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH10B (109 – 1010 cfu/ng de DNA) (One Shot Max Efficiency DH10B T1r, Invitrogen®). Foram adicionados 4 µL da reação de ligação a 50 µL de células competentes e a mistura foi mantida por 20 minutos em gelo. O choque térmico das células foi realizado colocando os microtubos em banho de água a 42°C por 50 segundos e, em seguida, transferindo-os novamente para o gelo por 2 minutos. Foram adicionados 950 µL 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 µg/mL de ampicilina e preparadas com 40 µl de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (0,026%) e IPTG (isopropylthio-β-galactoside) (0,82mM) foram adicionados 100 µl de células transformadas. As colônias de bactérias contendo estes clones (colônias brancas) foram transferidas para tubos cônicos para centrifuga de 15 mL contendo 3 mL de meio líquido 2xTY e 100 µg/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C por até 24 horas, foi realizada a análise dos clones transformantes.

#### **5.5 Mini-preparação de DNA Plasmidial (Método da Lise Alcalina)**

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o Método da Lise Alcalina (SAMBROOK et al., 2001). Os tubos foram incubados “overnight” a 37°C sob agitação de 250 rpm. e, em seguida, centrifugados para a formação do pellet e adicionados 100 µL de solução Glicose-EDTA-Tris HCL (23 mL de glicose 20%; 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 13 mL de Tris-HCL 1M pH 7,4 e água destilada q.s.p. 500 mL). Após homogeneização acrescentou-se 200 µL da solução de lise (1mL de NaOH, 500µL de SDS 10%, água destilada q.s.p. 5 mL). A mistura foi realizada por inversão e as amostras deixadas em gelo por 5 minutos. Após a adição de 150 µL de acetato de potássio 3M, as amostras foram misturadas, deixadas no gelo novamente por 5 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para

um novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, misturado e colocado no freezer -80°C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70% e as amostras submetidas a agitação até o descolamento do pellet. Foi feita centrifugação por 5 minutos em temperatura ambiente, descarte do sobrenadante e secagem dos tubos a vácuo por 5 minutos. Foram adicionados 100 µL de RNAase (200µg/mL) e as amostras deixadas em banho-maria a 37°C durante 2 horas. Após o banho, foi feita extração com 50 µL de fenol equilibrado em Tampão TE e a mistura foi homogeneizada em agitador por 1 minuto e centrifugada conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com 10 µL de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200 µL de etanol absoluto. Após 15 minutos em temperatura de -80°C, a mistura foi novamente centrifugada e, desta vez, o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo por 5 minutos e diluído em água ultra pura.

## **5.6 Análise dos clones recombinantes e amostras purificadas da PCR**

### **5.6.1 Seqüenciamento**

O seqüenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram, para os produtos clonados, o “M13 foward” (5'-GTA AAA CGA CGC CGC CCA-3') e “M13 reverse” (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3') conforme indicação no kit do vetor de clonagem, e para os produtos da nPCR, os primers utilizados foram aqueles mesmos descritos, para cada agente, na Tabela 1. 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). Utilizou-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl<sub>2</sub>); 0,5 µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra pura e 1,5 µL de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de

agarose 0,8%. As ampliações foram realizadas inicialmente no termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos e mantida a 4°C por tempo indeterminado, para os produtos clonados, sendo que para os produtos da nPCR, as seqüências térmicas foram aquelas especificadas na Tabela 2.

O processo de lavagem das amostras foi feito adicionando-se 80 µL 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 µL de Etanol 70% foi adicionado 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).

### **5.6.2 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). A triagem foi realizada pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos seqüenciamentos dos fragmentos, 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 Cross-match (EWING et al., 1998; <http://www.phrap.org>) foi utilizado para identificar seqüências do vetor e realizar o alinhamento da seqüência consenso. O programa BLAST (BENSON et al., 2002) foi utilizado para analisar as seqüências de nucleotídeos, objetivando-se procurar e comparar seqüências similares em banco de dados internacionais (GenBank) com aquelas obtidas.

## 6. Enzimas de restrição

Foram realizados testes utilizando-se as enzimas AVA-I e Eco – NI para amostras positivas para o genogrupo de *A. phagocytophilum*. A enzima Ava I não cliva o agente *A. phagocytophilum*, mas cliva *A. platys* em dois fragmentos: 561 e 369 pb; e a Eco NI cliva *A. phagocytophilum* e *A. platys* em dois fragmentos: 282 e 649, e 280 + 651 pb. Apesar desta última enzima clivar os dois agentes, essa clivagem auxilia na confirmação da especificidade do amplímero obtido (DAGNONE, 2006).

As reações de clivagem foram realizadas utilizando-se 14µL da amostra adicionada a 6µL de mix para cada enzima, composto de 10 U da enzima Ava I e Eco NI, Tampão respectivo de cada enzima 1X, e água ultra pura estéril para completar o volume final de 20µL. Todas as amostras foram incubadas a 37°C em um banho-seco (Boeckel Scientific™) por uma hora e trinta minutos. Após a incubação, as amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen®) a 1,3% (Apêndice), corado com Brometo de Etídeo 0,01% (Invitrogen®), em cuba horizontal, com solução de TEB 1X como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e cinquenta minutos, com fonte a 50mA e 100V. Um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Invitrogen®) foi adicionado na primeira canaleta de cada gel analisado, para obter uma medida comparativa dos tamanhos dos produtos clivados (DAGNONE, 2006).

## 7. Construção de árvore filogenética

Árvores Filogenéticas são gráficos que ilustram as relações evolutivas entre organismos individuais ou em grupos. Neste trabalho, para a geração da árvore utilizou-se o método de distância Kimura-2 parâmetros e para a reconstrução gênica o algoritmo “Neighbor-Joining” (NJ), com um teste estatístico de confiança em topologia denominado “bootstrap”.

Utilizou-se o Programa MEGA (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software”) para explorar e analisar o alinhamento de seqüências de DNA sob uma

perspectiva evolutiva. Esse programa pode receber dados diretamente salvos no programa Clustal, realizar as análises e, então, construir a árvore filogenética (TAMURA et al., 2007).

## **8. Análise estatística**

A análise estatística foi executada utilizando o programa Minitab ® Release 14 Statistical Software v. 14, 2003. Os dados foram inseridos em um banco de dados do programa e o teste do qui-quadrado foi aplicado para comparar a ocorrência dos patógenos nas diferentes áreas. Os resultados cujo valor de P foram inferiores ou iguais a 0,05, são considerados estatisticamente significativos. O índice Kappa foi utilizado para quantificar o grau de concordância entre os testes de PCR e RIFI.

## **IV) RESULTADOS**

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

#### **1.1 Sorologia para *Ehrlichia chaffeensis***

Dos 143 soros de cervos testados, 116 (81,12%) mostraram reatividade ao antígeno de *Ehrlichia chaffeensis*, representada pela presença de mórulas fluorescentes no interior das células. No que se refere aos diferentes locais de captura dos animais, 76,76% (76/99), 88, 88 % (8/9), 88,88% (16/18) e 94,12% (16/17) dos cervos provenientes de MS01, PX01, MS02 e AGUA, respectivamente, apresentaram sororeatividade (Tabela 3). A triagem dos soros foi realizada em diluição de 1:40, e a diluição do conjugado anti-IgG de veado foi fixada em 1:10, conforme recomendações do fabricante e testes realizados neste estudo.



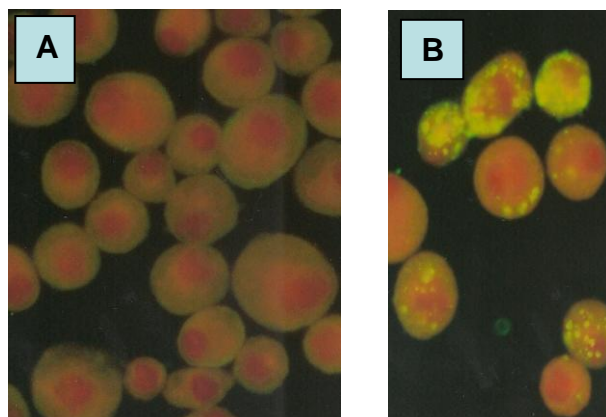


Figura 4. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de *E. chaffeensis*, Reação de Imunofluorescência Indireta. **A)** Amostra negativa. **B)** Amostra positiva, evidenciando fluorescência intensa nas mórulas. Aumento de 400X.

Tabela 3. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de *E. chaffeensis*, Reação de Imunofluorescência Indireta. Os animais foram agrupados de acordo com a área e momento de captura. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa.

Área de captura e número de animais/área	Sororeatividade a <i>E. chaffeensis</i>	
	Total	%
MS01 / 99	76	76,76a
PX / 9	8	88,88a
MS02 / 18	16	88,88a
AGUA / 17	16	94,12a
<b>TOTAL / 143</b>	<b>116</b>	<b>81,12</b>

## 1.2 Sorologia para *Anaplasma phagocytophilum*

Na pesquisa de anticorpos para *Anaplasma phagocytophilum*, 24 (16,78%) dos 143 soros testados apresentaram reatividade ao antígeno, representado também por mórulas fluorescentes no interior da célula. Quanto ao local de captura, obteve-se 20,20% de positivos em MS01, 22,22% em PX01, 5,55% em MS02 e 5,88% em AGUA (Tabela 4, Figura 5).

A triagem dos soros foi realizada em diluição de 1:40, e a diluição do conjugado anti-IgG de veado foi fixada em 1:10, conforme recomendações do fabricante e testes realizados neste estudo.

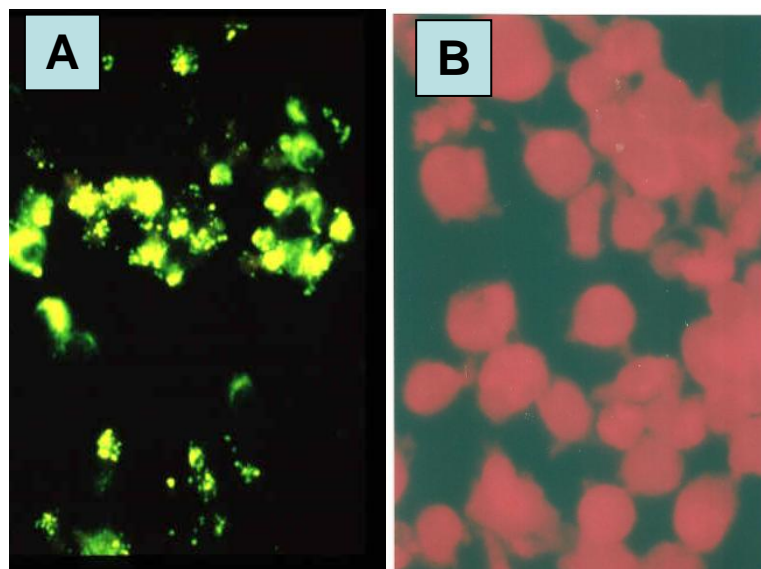


Figura 5. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de *A. phagocytophilum*, Reação de Imunofluorescência Indireta. **A)** amostra positiva (400X); **B)** amostra negativa (1000X).

Tabela 4. Sororeatividade de cervos-do-Pantanal ao antígeno de *A. phagocytophilum*, Reação de Imunofluorescência Indireta. Os animais foram agrupados de acordo com a área de captura. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa.

Área de captura e número de animais/área	Sororeatividade a <i>A. phagocytophilum</i>	
		%
MS01 / 99	20	20,20 <sup>a</sup>
PX01 / 9	2	22,22 <sup>a</sup>
MS02 / 18	1	5,55 <sup>a</sup>
AGUA / 17	1	5,88 <sup>a</sup>
TOTAL / 143	24	16,78

## 2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

### 2.1 Nested PCR para *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *Anaplasma marginale*, *A. phagocytophilum* e *Neorickettsia risticii*

Dos 143 animais testados, 61 (42,65%) apresentaram banda compatível (410 pb) com aquela determinada pelo controle positivo de *E. chaffeensis*, sendo 38 (38,38%) provenientes de MS01, 4 (44,44%) de PX01, 12 de MS02 (66,66%) e 7 (41,18%) de AGUA (Tabela 5). Amostras positivas purificadas da nested PCR foram enviadas para seqüenciamento e os resultados revelaram 100% de similaridade com amostras de *Ehrlichia chaffeensis* da Argentina e dos Estados Unidos, (números de acesso no Genbank EU826516.2 e AF416764.1, respectivamente) (Figura 6). Foram ainda realizados testes para o gene *dsb* e as amostras positivas, enviadas para seqüenciamento, revelaram 96% de similaridade apenas com *Ehrlichia chaffeensis* (números de acesso no Genbank CP000239.1 e AF403711.1). Já para o genogrupo de *A. phagocytophilum*, 70 (48,95%) cervos foram considerados positivos, apresentando banda na altura de 546 pb, como aquela determinada pelo controle positivo (Figura 7). Destes, 51 (51,51%) são provenientes de MS01, 12 (66,66%) de MS02 e 7 (41,18%) de AGUA. Animais provenientes de PX01 foram todos negativos (Tabela 5). Seis amostras positivas para o genogrupo *A. phagocytophilum*, purificadas e clonadas, foram enviadas para seqüenciamento. As análises das seqüências mostraram 99% de similaridade com uma amostra de *Anaplasma* spp. proveniente do intestino delgado de mosquitos do gênero *Anopheles* (número de acesso no Genbank AY837739.1), bem como com *A. platys* (número de acesso no Genbank EU439943.1). Segundo os trabalhos analisados, há maior similaridade com *A. platys* e em segundo lugar com *A. phagocytophilum*. Frente a esses resultados, amostras previamente positivas na nested PCR para *A. phagocytophilum* foram então testadas para o mesmo agente em PCR simples (MSP2) e também para *A. platys* (16S). Nesses testes, todas as amostras mostraram-se negativas. Com relação a PCR para *A. marginale*, obteve-se a formação de bandas inespecíficas e resultados conclusivos não foram alcançados. No

seqüenciamento, a análise não revelou similaridades com amostras de *A. marginale*. No que se refere a PCR para *E. canis*, também houve formação de bandas inespecíficas, em diferentes alturas, na grande maioria das amostras, sendo estas consideradas negativas, uma vez que o seqüenciamento também não revelou similaridades.

Quanto ao testes para *E. ewingii*, todos apresentaram-se negativos. Em relação a *N. risticii*, não houve formação de banda característica quando as 143 amostras foram testadas.

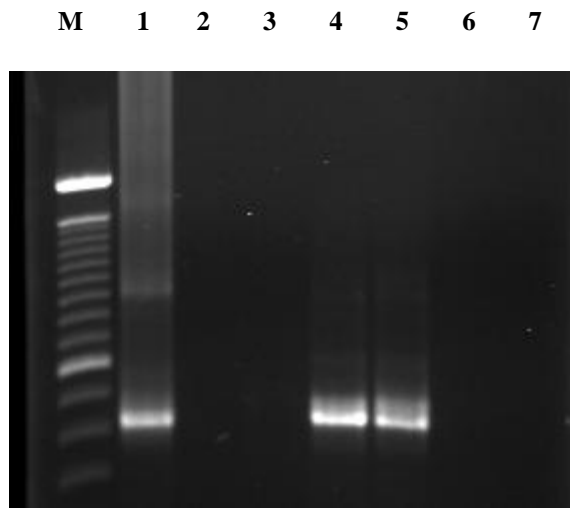


Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas de amplicómeros de animais positivos pela nested PCR para *Ehrlichia chaffeensis*. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (410 pb); Canaleta 7: branco; Canaletas 2, 3 e 6: amostras negativas de cervos-do-Pantanal; Canaletas 4 e 5: amostras positivas de cervos-do-Pantanal.

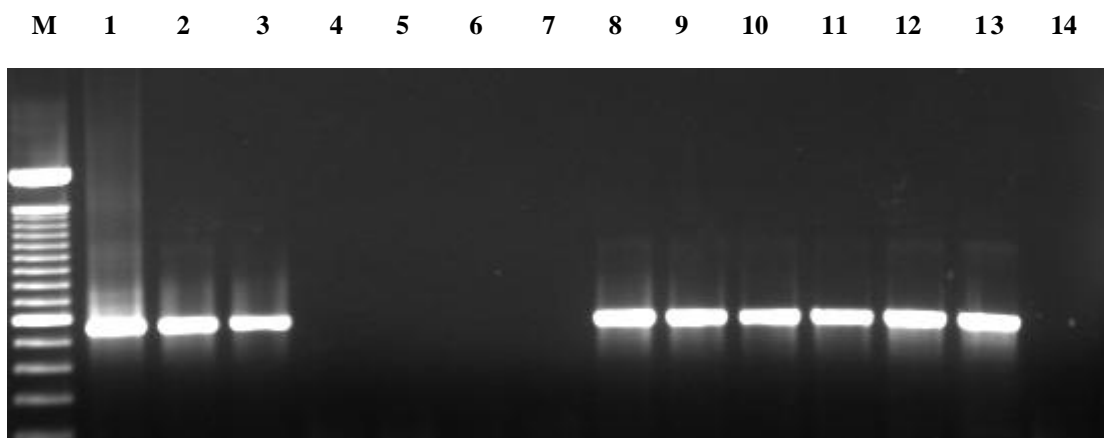


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas de amplicómeros de animais positivos pela nested PCR para o genótipo *Anaplasma phagocytophilum*. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (546 pb); Canaleta 14: branco; Canaletas 4, 5, 6 e 7: amostras negativas de cervos-do-Pantanal; Canaletas 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12 e 13: amostras positivas de cervos-do-Pantanal.

Tabela 5. Resultados da nested PCR para *E. chaffeensis* e para o genótipo de *A. phagocytophilum* de acordo com a área e momento de captura dos cervos-do-pantanal. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa.

Área de captura/ nº de animais	nPCR <i>E. chaffeensis</i>	nPCR <i>A. phagocytophilum</i>
MS01(99)	38 (38,38%)a	51 (51,51%)a
PX01 (9)	4 (44,44%)a	0 (0 %)b
MS02 (18)	12 (66,66%)a	12 (66,66%)a
AGUA (17)	7 (41,18%)a	7 (41,18%)a
TOTAL(143)	61(42,65%)	70 (48,95%)

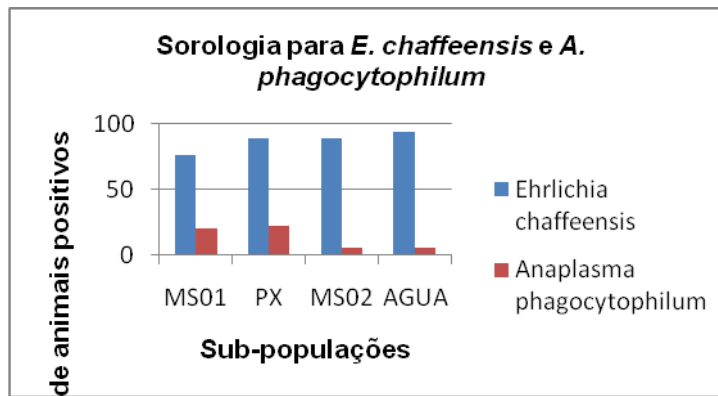


Figura 8. Gráfico demonstrando a porcentagem de cervos-do-pantanal soros-reagentes aos antígenos de *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*, em quatro sub-populações (MS01, PX, MS02, AGUA), utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

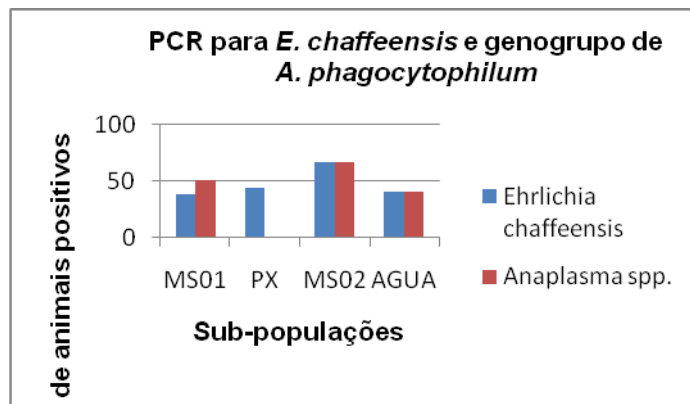


Figura 9. Gráfico demonstrando a porcentagem de cervos-do-pantanal em que detectou-se DNA de *Ehrlichia chaffeensis* e de *Anaplasma spp.*, em quatro sub-populações (MS01, PX, MS02 e AGUA), utilizando a Reação em Cadeia pela polimerase (PCR).

Tabela 6. Co-soropositividade e co-soronegatividade de cervos-do-pantanal testados pela RIFI para os antígenos de *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*.

<b>RIFI</b>	<b>Animais sororeagentes a <i>E. chaffeensis</i></b>	<b>Animais não-sororeagentes a <i>E. chaffeensis</i></b>	<b>Total</b>
<b>Animais sororeagentes a <i>Anaplasma</i> spp</b>	16 (11,1%)	8 (5,5%)	24
<b>Animais não-sororeagentes a <i>Anaplasma</i> spp</b>	100 (69,9%)	19 (13,2%)	119
<b>Total</b>	116	27	143

Tabela 7. Co-positividade e co-negatividade de cervos-do-pantanal testados pela PCR para *E. chaffeensis* e para *A. phagocytophilum*.

<b>PCR</b>	<b>Animais positivos para <i>E. chaffeensis</i></b>	<b>Animais negativos para <i>E. chaffeensis</i></b>	<b>Total</b>
<b>Animais positivos para <i>A. phagocytophilum</i></b>	37 (25,8%)	33 (23,0%)	70
<b>Animais negativos para <i>A. phagocytophilum</i></b>	24 (16,7%)	49 (34,2%)	73
<b>Total</b>	61	82	143

Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos na RIFI e na PCR para *E. chaffeensis* nos testes com amostras de cervos-do-pantanal.

<i>E. chaffeensis</i>	RIFI +	RIFI -	Total
PCR +	49 (34,2%)	12 (8,3%)	61
PCR -	67 (46,8%)	15 (10,4%)	82
<b>Total</b>	116	27	143

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos na RIFI e na PCR para *A. phagocytophilum* nos testes com amostras de cervos-do-pantanal.

<i>A. phagocytophilum</i>	RIFI +	RIFI -	Total
PCR +	13 (9,0%)	57 (39,8%)	70
PCR -	11 (7,6%)	62 (43,3%)	73
<b>Total</b>	24	119	143



### 3. Demonstração de Dendogramas Filogenéticos das seqüências obtidas dos amplicómeros com alinhamento múltiplo pelo CLUSTAL-W e Mega-4

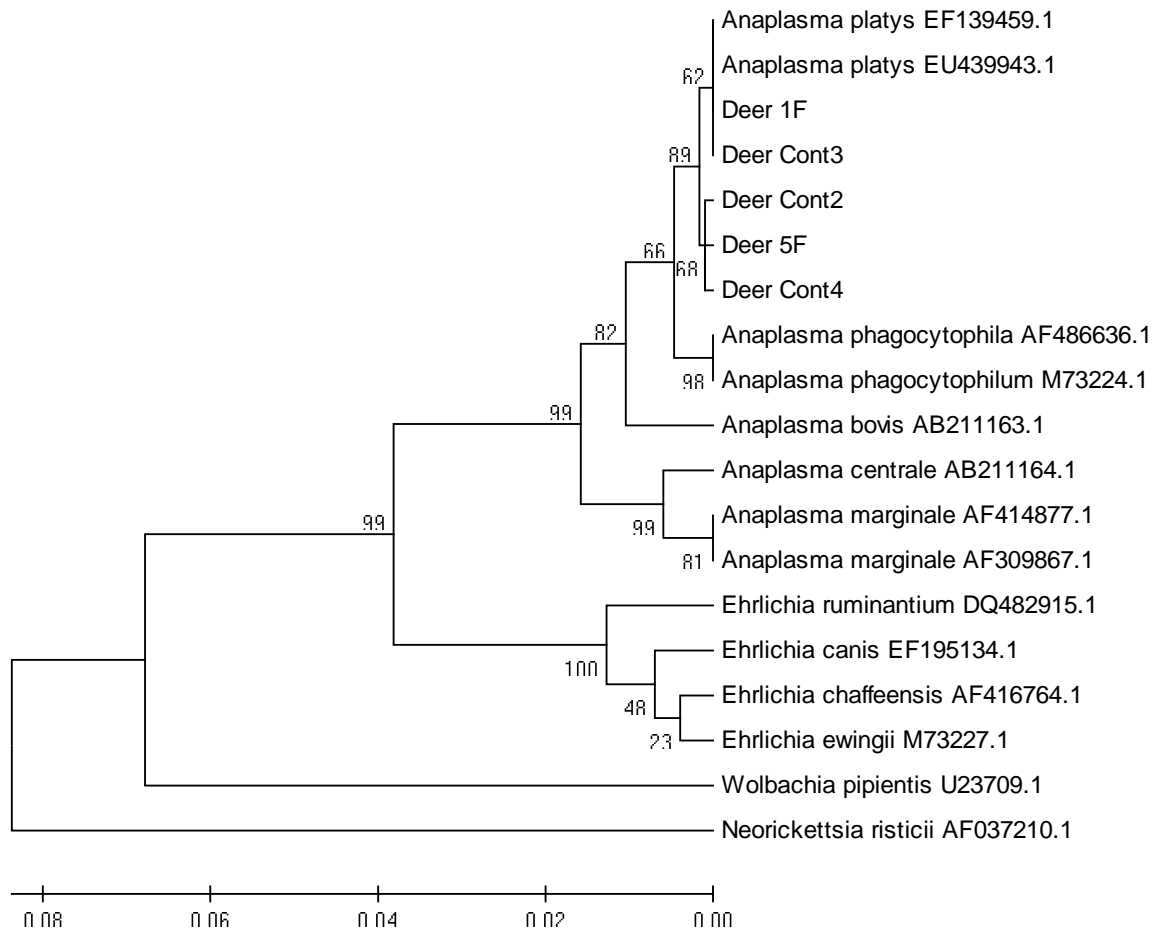


Figura 10. Dendrograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Anaplasma* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cervos-do-pantanal naturalmente infectados (Amostras *Anaplasma* spp. Deer 1F, Cont2, Cont3, Cont4 e 5F). O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 2.000 repetições. As seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso no Genbank.

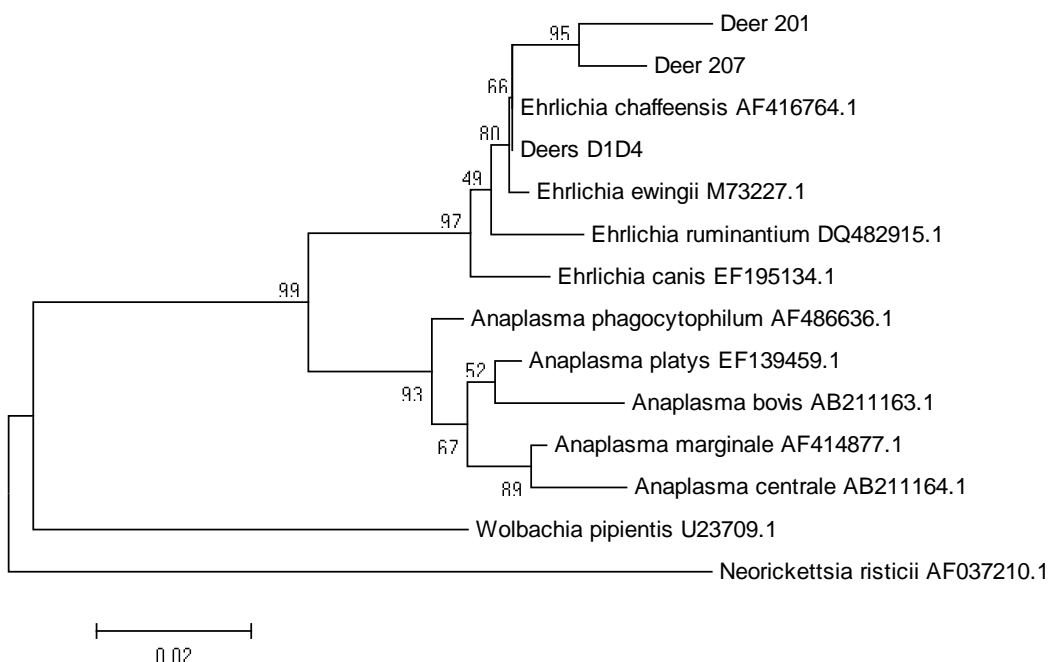


Figura 11. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Ehrlichia* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cervos-do-pantanal naturalmente infectados (Amostras *Ehrlichia chaffeensis* Deer 201, Deer 207 e Deers D1 D4). O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 2.000 repetições. As seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso no Genbank.

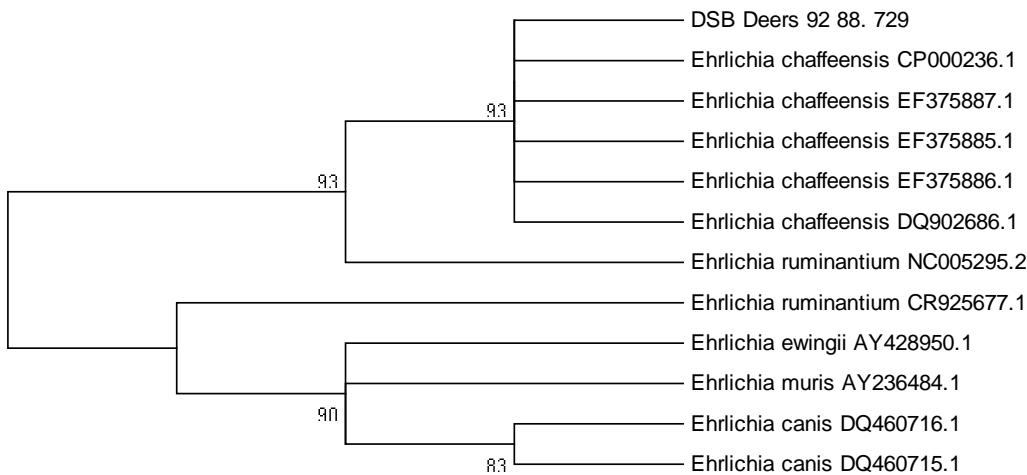


Figura 12. Dendograma Filogenético exibindo a amostra positiva para o gênero *Ehrlichia* obtidas com seqüências parciais do gene dsb (5'- 3') de amostras de sangue de cervos-do-pantanal naturalmente infectados (Amostra MD *Ehrlichia chaffeensis* 92 88729.b) O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 2.000 repetições. As seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso no Genbank

#### **4. Enzimas de Restrição**

Não obtivemos resultados satisfatórios com os testes das enzimas uma vez que tivemos dificuldades em visualizar a banda de *A. phagocytophilum* na primeira reação da PCR, ou seja, amplificação dos fragmentos se dá principalmente pela nPCR, e o corte pelas enzimas seria realizado na banda da PCR.

#### **5. Análise estatística**

Não observamos diferenças significativas considerando a ocorrência dos patógenos nas diferentes áreas estudadas ( $P \geq 0,05$ ), exceto na comparação de nPCR de *A. phagocytophilum* da área de PX com as demais ( $P \leq 0,05$ ). No índice kappa, o grau de concordância entre os testes de PCR e RIFI para *E. chaffeensis* foi pobre ( $\leq 0,20$ ), enquanto para *A. phagocytophilum* foi fraco (0,21 – 0,40).

## V. DISCUSSÃO

Atualmente e em todo o mundo, várias pesquisas têm sido realizadas para investigar o possível papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças transmitidas por artrópodes vetores, as quais ajudariam na determinação de áreas de risco para possível infecção humana. A respeito da epidemiologia da erliquiose e anaplasose em cervídeos, diversos estudos estão sendo conduzidos para avaliar o papel destes animais e de carrapatos ixodídeos na manutenção e transmissão dos agentes rickettsiais no meio natural. A identificação de reservatórios domésticos e selvagens para hemoparasitoses é de grande valia na elaboração de medidas profiláticas que venham reduzir a exposição do homem, e outros animais domésticos e selvagens à infecção.

A pesquisa da evidência de infecções por agentes rickettsiais em cervos-do-pantanal, oriundos de áreas inundadas por hidrelétricas, permitiu estabelecer importantes considerações. Quando são analisadas amostras colhidas antes e após a inundação da área, pode-se avaliar o impacto causado pela instalação de usinas hidrelétricas sobre uma população animal, no que se refere à dinâmica de enfermidades.

MACHADO et al (2006) identificaram, pela primeira vez no Brasil, DNA de *Ehrlichia chaffeensis* em amostras de sangue de cervos-do-pantanal provenientes da área de instalação da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, no Rio Paraná. Tal relato suscitou o questionamento a respeito do papel dos animais na epidemiologia da erliquiose monocítica humana no Brasil, uma vez que suspeitas clínicas e ocorrência de anticorpos para agentes erliquiais em humanos foram relatados (GALVÃO et al., 2002, CALICI et al., 2004, COSTA et al., 2004 e COSTA et al., 2005). No entanto, vale ressaltar que os testes sorológicos para detecção de anticorpos aos agentes erliquiais não são específicos e, apenas por técnicas moleculares, a detecção específica de cada agente pode ser alcançada.

Além de *E. chaffeensis*, DNA de *A. marginale* também foi identificado nos cervos (MACHADO et al., 2006), o que demonstra que a epidemiologia da anaplasose também requer maiores investigações. Os mamíferos selvagens, principalmente

capivaras e veados infestados por carrapatos vivem em estreito contato com o gado, cavalos e cães, com quem compartilham os mesmos carrapatos, oferecendo riscos de transmissão de enfermidades comuns e zoonoses aos animais domésticos e ao homem (FIGUEIREDO et al., 1999).

No presente trabalho, a avaliação da frequência de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e anti-*A. phagocytophilum* foi realizada em 143 amostras de soros de cervos, provenientes da área de instalação da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera. Na Reação de Imunofluorescência Indireta, um total de 81,12% (116/143) dos animais mostrou sororreatividade ao antígeno de *E. chaffeensis*, enquanto 16,78% (24/143) foram soropositivos ao antígenos de *A. phagocytophilum*, ambos com título  $\geq$  1:40. Também ARENS et al. (2003), nos Estados Unidos, encontraram resultados semelhantes àqueles demonstrados neste trabalho, em que 87% (97/112) dos veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) testados foram soros-reagentes a *E. chaffeensis*, obtendo apenas 2% (2/112) de soroprevalência para *A. phagocytophilum*, ambos com títulos  $\geq$  1:64. Entretanto, STUEN et al (2002), em estudo realizado na Noruega, obteve soroprevalência de 43%, 55% e 96% para *A. phagocytophilum* em amostras de *Alces alces*, *Cervus elaphus* e *Capreolus capreolus*, respectivamente, utilizando diluição inicial de 1:40. Similarmente, na Suíça, 80,9% (81/133) de *C. capreolus* e 28,2% (11/39) de *Rupicapra rupicapra* foram soros-reagentes ao antígeno de *A. phagocytophilum* (LIZ et al., 2002).

Vários estudos soroepidemiológicos demonstram reatividade a antígenos de agentes erliquiais em veado-de-cauda-branca nos Estados Unidos, com frequência de anticorpos variando de 2% a 92% (WALLS et al., 1998; LITTLE et al., 1997; LOCKHART et al., 1997; IRVING et al., 2000; MUELLER-ANNELING et al., 2000; STEINER et al., 1999; YABSLEY et al., 2002; ARENS et al., 2003).

Neste trabalho, a alta prevalência de cervos contendo anticorpos para *E. chaffeensis* foi, de certa forma, acompanhada pela alta prevalência de animais PCR positivos para o mesmo agente (42,65%). É importante considerar que, DAWSON et al. (1994a), em trabalho com infecção experimental de *E. chaffeensis* em veado-de-cauda-branca (*O. virginianus*) nos Estados Unidos, mostraram que os veados mantêm

bactérias circulantes por pelo menos duas semanas, sendo que os anticorpos foram detectados cerca de 10 dias após a inoculação, sem evidência de doença clínica. Ainda, DAVIDSON et al (2001) observaram que os veados (*O. virginianus*) inoculados intravenosamente com a cepa de *E. chaffeensis*, mostraram bacteremia durante 24 dias após a inoculação, e todos desenvolveram títulos de anticorpos  $\geq 1:64$ , no décimo sétimo dia após a infecção, também sem exibição de manifestações clínicas. Além disso, LOCKHART et al. (1997) obtiveram isolamento de *E. chaffeensis* a partir do sangue de veados cujos PCRs foram negativos.

Os nossos resultados levam-nos a inferir que, alguns cervos poderiam estar em período de riquetssemia antes da soro-conversão e assim apresentaram PCR positivo e sorologia negativa; outros animais poderiam estar em fase crônica, e assim apresentaram PCR negativo e sorologia positiva; e ainda poderia haver riquetssemia baixa, não detectada na PCR, talvez somente detectada no isolamento e na cultura. Resumidamente, os animais PCR negativos para *E. chaffeensis* neste estudo não apresentavam bactérias circulantes ou as possuíam em reduzido número no momento da colheita da amostra.

Na sorologia, deve-se considerar sempre a possibilidade de reação cruzada entre diferentes espécies de *Ehrlichia* spp., entre espécies de *Anaplasma* e ainda entre *Ehrlichia* spp. e *Bartonella* spp. (BROUQUI et al., 2001; DREHER et al., 2005). A ocorrência de reatividade cruzada entre *A. marginale* e *A. phagocytophilum*, nos testes de ELISA e RIFI, foi relatada por Dreher et al., 2005, assim como entre *E. canis* e *E. chaffeensis* (NEER et al., 2002).

Na PCR para o gene 16S rRNA de *E. chaffeensis*, observamos positividade de 42,65% (61/143) nas amostras estudadas. Nas pesquisas realizadas com veado de cauda branca nos Estados Unidos, nota-se menor prevalência na PCR, uma vez que ARENS et al. (2003) obtiveram 23% (50/217) e YABSLEY et al. (2002) encontraram 5,5% (6/110) de amostras positivas. Em nosso estudo, o seqüenciamento das produtos da PCR revelou até 100% de identidade com seqüências de *E. chaffeensis* depositadas no Genbank e provenientes dos Estados Unidos e da Argentina, apesar do reduzido tamanho do fragmento (semelhante a 380pb). Além disso, algumas amostras positivas

foram testadas também com o protocolo para o gene *dsb*, e a análise pelo BLAST mostrou 96% de similaridade com seqüências somente de *E. chaffeensis*. Os testes da PCR com genes diferentes para determinado agente contribuem para a realização de um diagnóstico específico, já que pequenas diferenças (>0,5%), considerando o gene 16S rRNA, são significativas para o gênero *Ehrlichia* (ANDERSON et al., 1991). A confecção de árvores filogenéticas, a partir de seqüências parciais dos genes 16SrRNA e *dsb*, permitiu a visualização da proximidade filogenética entre as amostras do gênero *Ehrlichia* obtidas dos cervos e seqüências de *E. chaffeensis* depositadas no Genbank, com “bootstrap” razoavelmente alto (entre 80 e 95). Neste estudo, portanto, confirmamos a presença de DNA de *Ehrlichia chaffeensis* nas amostras de sangue dos cervos, porém estudos sobre os vetores da enfermidade ainda são escassos.

A PCR para o gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum* mostrou positividade em 48,95% (70/143) das amostras dos animais, enquanto que utilizando-se o protocolo para o gene MSP-2, as mesmas foram negativas. Menor prevalência em cervídeos é relatada por LIZ et al. (2002), os quais encontraram 18,4% (19/103) de prevalência na PCR para 16S rRNA de *A. phagocytophilum* em *C. capreolus*, na Suíça. Interessantemente, MASSUNG et al. (2003), comparando diferentes protocolos da PCR utilizados na detecção de *A. phagocytophilum*, relataram que o protocolo utilizado em nosso trabalho para o gene 16S rRNA foi considerado de alta sensibilidade e especificidade na pesquisa da bactéria, assim como o protocolo da PCR para o gene da proteína MSP-2, o que não foi confirmado em nossos resultados. No entanto, considera que dramáticas diferenças são notadas entre essas duas técnicas quando elas são analisadas por diversos kits comerciais de PCR: enquanto o protocolo do 16S parece não sofrer influência pela utilização de kits diferentes (qualidade da enzima Taq Polimerase, concentração de MgCl<sub>2</sub>, concentração dos primers) a técnica envolvendo MSP-2 mostra limites variáveis de detecção e/ou especificidade (MASSUNG et al., 2003).

Em nosso trabalho, os resultados do seqüenciamento dos produtos obtidos da PCR para *A. phagocytophilum* revelaram que a seqüência do fragmento de DNA de *Anaplasma* evidenciada nos testes tem maior proximidade filogenética com *A. platys* e

em segundo lugar com *A. phagocytophilum*. Resultados semelhantes foram obtidos por MUNDERLOH et al. (2003) em pesquisa de isolamento do agente denominado “White tail deer agent” (“WTD agent”), no qual observaram tratar-se de uma espécie de *Anaplasma* mais relacionada a *A. platys* do que à *A. phagocytophilum*, considerações corroboradas por DUMLER et al., 2001. Alguns estudos indicam a ocorrência de alta prevalência, pela PCR, do “WTD agent” nos veados-de-cauda-branca nos Estados Unidos (BRANDSMA et al., 1999; DAWSON et al., 1996). No entanto, em nossos resultados de seqüenciamento, não houve similaridade com as seqüências deste agente depositadas no Genbank. O dendograma filogenético construído por meio da análise e alinhamento das seqüências obtidas das amostras dos cervos com seqüências depositadas no Genbank demonstrou a proximidade filogenética entre o *Anaplasma* spp. encontrado e *Anaplasma platys*, com “bootstrap” razoavelmente alto (89).

Analisando as diferentes sub-populações de cervos e comparando MS01 e MS02, verificou-se que houve tendência ao aumento da freqüência de anticorpos bem como de animais PCR positivos para *E. chaffeensis*, apesar de não ser estatisticamente significativo ( $P > 0,05$ ). Vale ressaltar que o número de animais experimentais oriundos das diferentes áreas sofreu grande variação, em função da dificuldade de captura e número de animais dentro de cada área. Em MS01, caracterizada por várzea relativamente preservada, os cervos tinham pouco contato com pastagens de fazendas vizinhas. Segundo SZABÓ et al. (2003), as espécies de carrapatos mais prevalentes colhidas nos cervos de MS01 capturados antes da inundação foram *Boophilus microplus* e *Amblyomma triste*. Após a inundação, verificou-se em MS02 aumento do parasitismo pelas mesmas espécies de carrapatos, *B. microplus* e *A. triste*, porém observou-se também a presença de *Anocentor nitens* e *Amblyomma cajennense*. Levando-se em conta que são citados, na América do Norte, vetores do gênero *Amblyomma* para *Ehrlichia chaffeensis* (KOCAN et al., 2000; GODDARD & VARELA-STOKES, 2009), pode-se inferir que o aumento da freqüência de anticorpos detectados em MS02 seja devido a um maior número de carrapatos do gênero *Amblyomma* parasitando os cervos. Além disso, segundo ANDRIOLO et al (2001), a redução da área



de várzea dos animais, após a inundação, levou a um aumento na densidade populacional de animais nesse local o que facilita provavelmente a disseminação do vetor ixodídeo e do agente entre os cervos, mais susceptíveis.

As áreas denominadas PX e AGUA representavam ambientes de certa forma alterados, nos quais várzeas estreitas já estavam presentes, e onde os cervos já se encontravam, em maior ou menor grau de competição por espaço e alimento, e em maior proximidade com fazendas vizinhas. As áreas referidas, portanto, representavam regiões onde os impactos das ações humanas já eram sentidos, antes mesmo da instalação da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera. Esses fatos colocam os animais das referidas áreas em situação semelhante daqueles de MS02, com altas freqüências de anticorpos anti-*E. chaffeensis* (PX, 88,88% e AGUA 94,12%), bem como de animais PCR positivos (PX 44,44% e AGUA 41,18%).

Há evidências de que o cervo-do-pantanal é o mais importante hospedeiro de carrapatos adultos da espécie *Amblyomma triste* na área estudada (SZABÓ et al., 2003). No Uruguai, onde atualmente o cervo está extinto (TOMAS et al., 1997), exemplares adultos de *A. triste* são freqüentemente encontrados em cães e humanos (CONTI DÍAZ, 2001; VENZAL et al., 2001), e estágios imaturos em marsupiais e roedores (VENZAL & FREGUEIRO, 1999). Essas considerações e nossos resultados sugerem que *A. triste* possa ser vetor biológico de *E. chaffeensis*, uma vez que, no Uruguai acredita-se que este parasita seja vetor da riquetsiose cutâneo-ganglionar em seres humanos (CONTI-DÍAZ, 2001; VENZAL et al., 2001). Analisando estas informações, devemos considerar duas situações quando o cervo-do-pantanal é ameaçado: se o cervo é obrigado a se deslocar para áreas mais secas, pela perda de habitat, há tendência ao aumento do parasitismo por *A. cajennense*, carrapato de ampla variedade de hospedeiros; se uma população de cervos sofre grandes baixas com tendência a extinção em determinada área, existe a possibilidade de *A. triste* adaptar-se a outros hospedeiros, como ocorreu no Uruguai. Em ambas as situações, há possibilidade de disseminação de *E. chaffeensis*. Assim, as transformações ecológicas e perdas de habitat, alterando as relações parasita-hospedeiro, interferem na

conservação de espécies selvagens e expõem o homem e outros animais a agentes infecciosos ainda não devidamente identificados.

Com relação aos testes para *A. phagocytophilum* e avaliando-se as áreas MS01 e MS02, verificou-se que houve tendência ao aumento de animais PCR positivos em MS02, mas tal aumento não foi acompanhado pelos resultados de soropositividade, ou seja, a porcentagem de animais positivos na RIFI foi maior em MS01. De forma semelhante, ARENS et al. (2003) obtiveram baixa soroprevalência para *A. phagocytophilum* entre os veados-de-cauda-branca (2%), apesar de alta prevalência (99%) nos testes de PCR para *Anaplasma* spp. Desta forma, pode-se considerar que na RIFI, utilizou-se antígeno específico para *A. phagocytophilum* e, pelos resultados do seqüenciamento, sabemos que trata-se de uma espécie de *Anaplasma* mais relacionada a *A. platys*, demonstrando a ocorrência de reatividade cruzada.

Não foram encontradas amostras PCR positivas para *E. canis*, dados que são corroborados por DAWSON et al (1994a) e ARENS et al. (2003). Em estudo experimental, DAWSON et al (1994a) conclui que a inoculação de *E. canis* nos veados não induz riquetssemia ou causa soro-conversão, enquanto ARENS et al (2003), em pesquisa de campo nos veados-de-cauda-branca abatidos em temporada de caça, não encontrou animais PCR positivos para este agente. Na sorologia, no entanto, a ocorrência de reação cruzada entre *E. canis* e *E. chaffeensis* é comum (NEER et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados para *E. ewingii* neste estudo, pois todas as amostras testadas pela PCR foram negativas. Nos Estados Unidos, entretanto, estudos apontam o veado-de-cauda-branca como hospedeiro de *E. ewingii*, sendo que YABSLEY et al. (2002) encontraram uma prevalência, pela PCR, de 5,5% (6/110) nestes animais.

No que se refere a *Neorickettsia risticii*, todos os animais testados neste trabalho foram negativos, o que pode estar relacionado a falta de hospedeiros para completar o ciclo da infecção na área estudada. Não há relatos na literatura da infecção de cervídeos por este agente, porém maiores investigações são necessárias, sobretudo no que diz respeito ao cervo-do-pantanal, pois o habitat desses animais pode ser propício ao desenvolvimento de hospedeiros de trematódeos (como certos caramujos)

supostamente envolvidos no ciclo da infecção (PUSTERLA et al., 2000; DUMLER et al., 2001). No Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul, foram identificados caramujos do gênero *Heleobia*, que albergavam cercárias do tipo *Parapleurolophocercous cercarie* como portadores de *N. risticii* (COIMBRA et al., 2003). Relatos de surtos da enfermidade em eqüinos, neste mesmo Estado brasileiro, foram realizados por Coimbra et al. (2006), ou seja, a bactéria está presente no Brasil, mas não há dados epidemiológicos da ocorrência da enfermidade na região de captura dos cervos.

Para *A. marginale*, os testes da PCR realizados para o gene MSP-5 revelaram a formação de bandas, porém a análise do seqüenciamento não revelou similaridades com o agente, e as amostras foram consideradas negativas. É sabido, no entanto, que a bactéria parasita os cervos da região estudada neste trabalho, uma vez que MACHADO et al. (2006) identificaram o DNA do agente nestes animais. Assim, maiores investigações são necessárias, aumentando-se o número de animais a serem utilizados, utilização de outros genes na PCR com maior sensibilidade e especificidade na detecção deste agente.

O conhecimento relacionado com a distribuição geográfica, potencial zoonótico e conseqüências patológicas das infecções erliquiais tem se expandido nos últimos anos. No Brasil, os estudos epidemiológicos e a identificação das espécies da Família Anaplasmataceae que acometem os animais selvagens e domésticos torna-se importante devido ao caráter zoonótico dos agentes erliquiais que ainda não estão bem identificados e caracterizados em animais e seres humanos (DUMLER et al., 1995; WALKER, 2005).

Além disso, esse conhecimento é importante no direcionamento de ações conservacionistas para animais selvagens, pois fornece a base para o entendimento da ecologia das enfermidades. Programas de reintrodução ou translocação de fauna são especialmente questionados neste aspecto, porque a relação parasita-hospedeiro não pode ser monitorada de perto no novo habitat, e os animais introduzidos podem estar susceptíveis a enfermidades ou disseminar os patógenos para a fauna local. Essas considerações são válidas inclusive quando os animais são trazidos para o cativeiro, pois as alterações ambientais e o estresse torna-os mais susceptíveis a enfermidades,

possibilitando inclusive a ocorrência de manifestações clínicas em animais portadores, com probabilidade de disseminação destes patógenos (SZABÓ et al., 2003).

O estudo de um maior número de amostras nacionais será muito importante não só para a confirmação do diagnóstico pelos agentes riquettsiais, mas também para caracterização molecular dos isolados, por meio da análise de vários genes. Tal caracterização permitirá não somente a pesquisa de variantes antigênicas como também auxiliará na realização de técnicas diagnósticas com material nativo, buscando maior acurácia nos resultados. Resumidamente, a PCR, seguida da caracterização molecular, auxiliará no emprego de técnicas mais específicas e sensíveis no diagnóstico da infecção pelos membros da família Anaplasmataceae no Brasil.

## VI. CONCLUSÕES

- Os cervos-do-pantanal provenientes da região de Porto Primavera, no Rio Paraná, estão expostos a infecção natural por agentes riquettsiais, sendo diagnosticado *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma platys*;
- A soroprevalência para *E. chaffeensis* foi maior que para *A. phagocytophilum*;
- A PCR associada ao seqüenciamento e à confecção de árvores filogenéticas permitiu a confirmação dos produtos da PCR para *E. chaffeensis*;
- O DNA de *E. chaffeensis* que infecta cervos-do-pantanal no Brasil apresentou similaridade genética com seqüências de DNA de outras *E. chaffeensis* relatadas nos EUA e na Argentina;
- O estudo de um maior número de amostras de animais selvagens e domésticos no Brasil será muito importante não só para a confirmação do diagnóstico pelos agentes riquettsiais, mas também para caracterização molecular dos isolados, por meio da análise de vários genes;

- A conservação das espécies animais em seu habitat natural contribui para uma menor exposição do homem e animais domésticos a enfermidades ainda não devidamente caracterizadas.

## VII. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 44, n. 1, p. 126–132, 2007.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.

ANDERSON, B. E.; SIMS, K. G.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E.; PIESMAN, J. F.; HAPP, C. M.; MAUPIN, G. O.; JOHNSON, B. J. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 49, p. 239-244, 1993.

ANDRIOLO, A.; PIOVEZAN, U.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; LAAKE, J.; DUARTE, J. M. B. Estimativa aérea de abundância e distribuição do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) na bacia do rio Paraná, entre as barragens de Porto Primavera e Jupiá em avaliação pré e pós enchimento da primeira cota da UHE Sérgio Mota. In: Duarte, J. M. B. (Ed.). **O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera**. Jaboticabal: FUNEP, 2001.

ARENS, M. Q.; LIDDELL, A. M.; BUENING, G.; GAUDREAU-KEENER, M.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; BULLER, R. S.; STORCH, G. A. Detection of *Ehrlichia* spp. in the blood of wild white-tailed deer in Missouri by PCR assay and

serologic analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 3, p. 1263-1265, 2003.

ARRAGA-ALVARADO, C.; MONTERO-OJEDA, M.; BERNARDONI, A.; ANDERSON, B. E.; PARRA, O. Human ehrlichiosis: report of the first case in Venezuela. **Invest. Clin.**, Maracaibo, v. 37, n. 1, p. 35-49, 1996.

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

BERNARDES, A. T.; MACHADO B. M. A.; RYLANDS. A. B. **Fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversistas para a Conservação da Diversidade Biológica, 1990. 62 p.

BRANDSMA, A. R.; LITTLE, S. E.; LOCKHART, J. M.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; DAWSON, J. E. Novel *Ehrlichia* organism (Rickettsiales: Ehrlichieae) in white-tailed deer associated with lone star tick (Acari: Ixodidae) parasitism. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 36, n. 2, p.190-194, 1999.

BROUQUI, P.; SALVO, E.; DUMLER, J. S.; RAOULT, D. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by immunofluorescence assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 8, n. 1, p. 199-202, 2001.

BULLER, R. S.; ARENS, M.; HMIEL, S. P.; PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; RIKHISA, Y.; UNVER, A.; GAUDREAUULT-KEENER, M.; MANIAN, F.A.; LIDDELL, A. M.; SCHMULEWITZ, N.; STORCH, G. A. *Ehrlichia ewingii* recognized agent of human ehrlichiosis. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 341, p. 148-155, 1999.

CALICI, S. B.; GALVÃO, M. A.M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichiosis in Brazil: first suspect case. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 8, p. 259-262, 2004.

CAO, W. C.; ZHAN, L.; HE, J.; FOLEY, J. E.; DE VLAS, S. J.; WU, X. M.; YANG, H.; RICHARDUS, J. H.; HABBEMA, J. D. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 664-668, 2006.

CASPERSEN, K.; PARK, J. H.; PATIL, S.; DUMLER, J. S. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila* msp2 (p44). **Infect. Immun.**, Washinton, v. 70, p. 1230-1234, 2002.

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*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Washington, v. 990, p. 248-256, 2003.

CHARITY, S. E.; TOMAS, W. M.; BUSCHINELLI, M. C. P. **Plano de manejo e conservação para o cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus*), U.H.E. Três Irmãos.** São Paulo: CESP, 1989.

COIMBRA, H. S.; FERNANDES, C. G.; SOARES, M. P.; MEIRELES, M. C. A.; RADAMÉS, R.; SCHUCH, L. F. D. Ehrlichiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesq. Vet. Bras.**, Brasília, v. 26 n. 2, p. 97-101, 2006.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. 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 nine new cases. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.10, n. 1, 2006.

CONTI-DÍAZ, I. A.. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (Febre botonosa del Mediterráneo o Febre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Rev. Med. Uruguay**, Montivideo, v. 17, p. 119- 124, 2001.

DAGNONE, A. S. **Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal- SP e de Campo Grande-MS.** 2006. 141 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DAVIDSON, W. R.; LOCKHART, J. M.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W.; DAWSON, J. E.; RECHAV, Y. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection in white-tailed deer. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 37, n. 3, p. 538-546, 2001.

DAWSON, J. E.; ANDERSON, B.E.; FISHBEIN, D. B.; SANCHEZ, J. L.; GOLDSMITH, C. S.; WILSON, K. H.; DUNTLEY, C. W. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 2741-2745, 1991.

DAWSON, J. E.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W.; WARNER, C.; BIGGIE, K.; DAVIDSON, W. R.; LOCKHART, J. M.; NETTLES, V. F.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 11, p. 2725-2728, 1994a.

DAWSON, J. E.; CHILDS, J. E.; BIGGIE, K. L.; MOORE, C.; STALLKNECHT, D.; SHADDOCK, J.; BOUSEMAN, J.; HOFMEISTER, E.; OLSON, J.G. White-tailed deer as a potential reservoir of *Ehrlichia* spp. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 30, n. 2, p. 162-168, 1994b.



DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; BAKER, V.; EWING, S. A.; STALLKNECHT, D. E.; DAVIDSON, W. R.; KOCAN, A. A.; LOCKHART, J. M.; OLSON, J. G. *Ehrlichia*-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 82, p. 52-58, 1996.

DREHER, U. M.; DE LA FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; PUSTERLA, N.; KOCAN, K. M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G.; STAERK, K. D.; LUTZ, H. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1177-83, 2005.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação dos cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 12 p.

DUARTE, J. M. B. Introdução geral. In: DUARTE, J. M. B. **O Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 1 CD-ROM.

DUARTE, J. M. B. Introdução geral. In: DUARTE, J. M. B. **Projeto Cervo-do-pantanal de Porto Primavera: relatório final**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 1 CD-ROM.

DUARTE, J. M. B. A Technique for the capture of the free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **J. Zoo. Wildl. Med.**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 596-599, 2008.

DUGAN, V. G.; GAYDOS, J. K.; STALLKNECHT, D. E.; LITTLE, S. E.; BEALL, A. D.; MEAD, D. G.; HURD, C. C.; DAVIDSON, W. R. Detection of *Ehrlichia* spp. in raccoons (*Procyon lotor*) from Georgia. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, New Rochelle, v. 5, n. 2, p. 162-171, 2005.

DUMLER, J. S. Anaplasma and Ehrlichia infection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Washington, v. 1063, p.361-373, 2005.

DUMLER, J. S.; ASANOVICHK, M.; BAKKEN, J. S.; RITCHER, P; KIMSEY, R. MADIGAN, J. E. Serologic cross-reaction among *Ehrlichia equi*, *E.phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J. S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HEG agent subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Insect Syst. Evolut. Microbiol.**, Leiden, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin. Infect Dis.**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 45 – 51, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 175-85, 1998.

FERQUEL, E.; GARNIER, M.; MARIE, J.; BERNÈDE-BAUDUIN, C.; BARANTON, FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, 1999. Disponível em: <[HTTP://dx.doi.org](http://dx.doi.org)>. Doi: 10.1590/S0037-6822006000100012 .

FERQUEL, E.; GARNIER, M.; MARIE, J.; BERNÈDE-BAUDUIN, C.; BARANTON, G.; PÉREZ-EID, C.; POSTIC, D. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. **Appl. Environ. Microbiol.**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 3074-3078, 2006.

FOLEY, J. E.; BARLOUGH, J. E.; KIMSEY, R. B.; MADIGAN, J. E; DEROCK, E.; POLAND, A. *Ehrlichia* spp. in cervids from California. **J. Wildl. Dis.**, Lawrence, v. 34, n.4, p. 731-737, 1998.

GALVÃO, M. A. M.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Emerging and reemerging rickettsiosis in a endemic area of Minas Gerais State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 1593-1597, 2002.

GIBSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; ZHANG, C.; MARTIN, C. *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 203-212, 2005.

GODDARD, J & VARELA-STOKES, A. S. Role of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), in human and animal diseases. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2; p. 1-12, 2009.

GOETHERT, H. K. & TELFORD, S. R. Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 633-637, 2003.

GONGÓRA-BIACHI, R.A.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J.; CASTRO-SANSORES, C.J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, P. First case of human ehrlichiosis in Mexico. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 5, p. 481, 1999.

GOODMAN, R. A.; HAWKINS, E.C.; OLBY, N.J.; GRINDEM, C.B.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E.B. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs: 15 cases (1997-2001). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 222, n. 8, p. 1102-7, 2003.

HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O.; SCORPIO, D.; DUMLER, J. S.; MANKOWSKI, J. Suspected cases of *Neorickettsia*-like organisms in Brazilian dogs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Washington, v. 1026, p. 79-83, 2004.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G.; BARAT, N. C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J. S. Suspected *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Ann. Emerg. Infect. Dis.**, Washington, v. 12, n. 8, p. 1303-1304, 2006.

HOLDEN, K.; BOOTHBY, J.T.; ANAND, S.; MASSUNG, R.F. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a coastal region of California. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 40, n. 4, p. 534-539, 2003.

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3031-3039, 2001.

IRVING, R.P.; PINGER, R. R.; VANN, C. N.; OLESEN, J. B.; STEINER, F. E. Distribution of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Amblyomma americanum* in southern Indiana and prevalence of *E. chaffeensis*-reactive antibodies in white-tailed deer in Indiana and Ohio in 1998. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 37, n. 4, p.595-600, 2000.

KIM, C. M.; YI, Y. H.; YU, D. H.; LEE, M. J.; CHO, M. R.; DESAI, A. R.; SHRINGI, S.; KLEIN, T. A.; KIM, H. C.; SONG, J. W.; BAEK, L. J.; CHONG, S. T.; O'GUINN, M. L.; LEE, J. S.; LEE, I. Y.; PARK, J. H.; FOLEY, J.; CHAE, J. S. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. **Appl. Environ. Microbiol.**, Amsterdam, v. 72, n. 9, p. 5766-7576, 2006.

KOCAN, A. LEVESQUE, G.C.; WHITWORTH, L. C.; MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; BARKER, R. W. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 6, p. 477-480, 2000.

KUTLER, K. L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 20, p. 12-20, 1994.

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. **J. Feline Med. Surg.**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 85-90, 2006.

LEMES, M. R. S.; RAMOS, H. G. C.; TORRES, H. A.; COSTA, M. J. R. P.; DUARTE, J. M. B. Relatos de Casos de Predação de Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) por Onça-Parda (*Puma concolor*) na Região do Entorno da Bacia Hidrográfica da Usina Hidroelétrica “Sérgio Mota”. In: DUARTE, J. M. B. **Projeto Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera**: relatório final. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 1 CD-ROM.

LEVIN, M. L.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, R. F.; SUMNER, J. W.; FISH, D. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector Borne Zoonot. Dis.**, New Rochelle, v. 2, n. 3, p. 125-136, 2002.

LITTLE, S.E.; DAWSON, J.E.; LOCKHART, J.M.; STALLKNECHT, D.E.; WARNER, C.K.; DAVIDSON, W. R. Development and use of specific polymerase reaction for the detection of an organism resembling *Ehrlichia* sp. in white-tailed deer. **J Wildl Dis.**, v. 33, n. 2, p. 246 – 253, 1997.

LIZ, J. S.; SUMNER, J. W.; PFISTER, K.; BROSSARD, M. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 3, p. 892-897, 2002.

LOCKHART, J. M.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; DAWSON, J. E.; HOWERTH, E. W. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 1681-1686, 1997.

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

MARTINEZ, A.; SALINAS, A.; MARTINEZ, F.; CANTU, A.; MILLER, D.K. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 35, n. 4, p. 799-803, 1999.

MASSUNG, R.; SLATER, K.; OWENS, J. H.; NICHOLSON, W. L.; MATHER, T. N.; SOLBERG, V. B.; OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection for Granulocytic Ehrlichiae. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 1090-1095, 1998.

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

MUELLER-ANNELING, L.; GILCHRIST, M. J.; THORNE, P. S. *Ehrlichia chaffeensis* antibodies in white-tailed deer, Iowa, 1994 and 1996. **Emerg. Infect Dis.**, Atlanta, v. 6, n. 4, p. 397-400, 2000.

MUNDERLOH, U. G.; TATE, C. M.; LYNCH, M. J.; HOWERTH, E. W.; KURTTI, T. J.; DAVIDSON, W. R. Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 9, 4328-35, 2003.

MUNSON, L.; KARESH, W. B. Disease monitoring the conservation of terrestrial animals. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. **Conservation medicine: ecological health in practice**. Oxford: Oxford University Press. 2002. p. 95-103.

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. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 79, p. 325-339, 1998.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the infectious Disease Study Group of the ACVIM. **J. Vet. Int. Med.**, Malden, v. 16, p. 309 – 315, 2002.

NUNES, A. L. V.; PINHO, M. P.; CRUZ, M. L.; DUARTE, J. M. B. Contenção química do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em vida livre: comparação entre diversas associações de drogas. In: DUARTE, J. M. B. **O Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. In: INTERNATIONAL MEETING ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 5., 2008, France. **Abstracts...** p. 68.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 16, p. 37-64, 2003.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Washington, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PERSING, D. H. PCR protocols for emerging infectious diseases. **A supplement to diagnostic molecular microbiology: principals and applications**. Washington: ASM Press, 1996.

PINDER, L.; SEAL, U. S. (Ed.). **Population and habitat viability assesment (PHVA) report for cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*)**. Apple Valley: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, 1995. 172 p



PIOVEZAN, U.; JACOB, A. A.; ANDRIOLO, A.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; DUARTE, J. M. B. Estudo preliminar dos efeitos da inundação provocada pela UHE Sérgio Mota (Porto Primavera) na sobrevivência e na definição de áreas de moradia do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) nas proximidades da foz do rio do Peixe, Estado de São Paulo, Brasil. In: DUARTE, J. M. B. **O Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 1 CD-ROM.

PUSTERLA, N.; MADIGAN, J. E.; CHAE, J. S.; DEROCK, E.; JOHNSON, E.; PUSTERLA, J. B. Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1293-1297, 2000.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E. M.; CHAE, J. S.; MADIGAN, J. E. Digenetic trematodes, *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp., as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. **J. Helminthol.**, London, v. 77, n. 4, p. 335-339, 2003.

RIPOLL, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of Rickettsial Spotted Fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 61, p. 350-354, 1999.

RIZZOLI, A.; ROSÉ, R.; MANTELLI, B.; PECCHIOLI, E.; HAUFFE, H.; TAGLIAPIETRA, V.; BENINATI, T.; NETELER, M.; GENCHI, C. *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p. 119-122, 2004.

RYKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the Family Anaplasmatidae. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Washington, n. 990, p. 548-555, 2003.

RYMASZEWSKA, A.; ADAMSKA, M. Participation of *Ixodes ricinus* developmental stages in transmission of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *phagocytophila*. **Wiad. Parazytol.**, v. 50, n. 3, p. 563-569, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2001. 999p.

SANGER, F; NICKLEN S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Ntl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: user guide manual: STAT, version 6.11. Cary, 1996.

SCHALLER, G. B.; VASCONCELOS, J. M. C. A marsh deer census in Brazil. **Oryx**, Oxford, v. 14, p. 345-351, 1978.

SKARPHÉDINSSON, S.; JENSEN, P. M.; KRISTIANSEN, K. Survey of tickborne infections in Denmark. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.11, n. 7, p. 1055-1061, 2005.

STEIERT, J. G.; GILFOY, F. Infection rates of *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* by *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in southwest Missouri. **Vector Borne Zoo. Dis.**, Larchmont, v. 2, n. 2, p. 53-60, 2002.

STEINER, F. E.; PINGER, R. R.; VANN, C. N. Infection rates of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) and prevalence of *E. chaffeensis*-reactive antibodies in white-tailed deer in southern Indiana, 1997. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 36, n. 6, p. 715-719, 1999.

STEINER, F. E.; PINGER, R.R.; VANN, C.N.; ABLEY, M.J.; SULLIVAN, B.; GRINDLE, N.; CLAY, K.; FUQUA, C. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia odocoilei* DNA in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) collected in Indiana. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 43, n. 2, p. 437-442, 2006.

STRLE, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v. 37, p. 27-35, 2004.

STUEN, S.; AKERSTEDT, J.; BERGSTRÖM, K.; HANDELAND, K. Antibodies to granulocytic Ehrlichia in moose, red deer, and roe deer in Norway. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 38, n. 1, p. 1- 6, 2002.

STUEN, S.; MOUM, T.; BERNHOFT, A.; VENE, S. A parietic condition in an *Anaplasma phagocytophilum* infected roe deer calf. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 42, n. 1, p. 170-174, 2006.

SZABÓ , M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. Ticks (Acari: Ixodidae) in Wild Marsh Deer (*B. Dichotomus*) from Southeast Brazil: Infestation before and after habitat loss. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 40, n. 3, p. 268-274, 2003.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007.

TOMAS, W. M.; BECCACECI, M. D.; PINDER, L. Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), pp. 24-40. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Funep, Jaboticabal: FUNEP, 1997.

TORIONI, E. S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 777-782, 1998.

TRAVASSOS, L. E. P. Impactos gerados pela Usina Hidrelétrica de Porto Primavera sobre o meio físico e biótico de Campinal, Presidente Epitácio, SP. **Rev. Biol. Ciênc.Terra**, Campina Grande, v. 1, n. 1, 2001. Disponível em: <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/resumos/UHEResumo.htm>>.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; OHASHI, N.; CULLMAN, L. C.; BULLER, R.; STORCH, G.A. Western and dot blotting analyses of *Ehrlichia chaffeensis* indirect fluorescent-antibody assay-positive and -negative human sera by using native and recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* antigens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 3888-3895, 1999.

VENZAL, J. M.; FREGUEIRO, G. Ixodidos parasitos de marsupiales (Didelphimorphia: Didelphidae) y roedores (Rodentia: Muridae) de la fauna Uruguaya. In: JORNADA DE CLÍNICA, REPRODUCCIÓN Y CONSERVACION DE ANIMALES SILVESTRES, 1999, Montivideo. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 1999.

VENZAL, J.; CASTRO, O.; CABRERA, P.; ARMÚA, M. Garrapatas de perros del Uruguay. Especies y distribución. In: CONGRESO NACIONAL DE VETERINARIA, 7., 2001, Montevideo, Uruguay.

WALKER, D. H. *Ehrlichia* under our noses and no one notices. **Archiv. Virol.**, New York, v. 19, suppl., p. 147-156, 2005.

WALLS, J. J.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Serologic evidence of a natural infection of white-tailed deer with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Maryland. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 5, n.6, p. 762 – 765, 1998.

WALTER, D. H.; DUMLER, J. S. Emergence of ehrlichiosis as human health problems. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 2, p.18-29, 1996.

WEMMER, C. **Deer status survey and conservation action plan**. Gland: IUCN/SSC Deer Specialist Group, 1998. 106 p.

WEN, B.; CAO, W; PAN, H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 990, p. 45-53, 2003.

WILLIAMS, C. V.; VAN STEENHOUSE, J. L.; BRADLEY, J. M.; HANCOCK, S. I.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in two prosimian primate species: ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) and ruffed lemurs (*Varecia variegata*). **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1497-1500, 2002.

YABSLEY, M. J.; VARELA, A.S.; TATE, C.M.; DUGAN, V.G.; STALLKNECHT, D.E.; LITTLE, S.E.; DAVIDSON, W.R. *Ehrlichia ewingii* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 7, p. 668-671, 2002.

YABSLEY, M. J.; NORTON, T. M.; POWELL, M. R.; DAVIDSON, W. R. Molecular and serologic evidence of tick-borne Ehrlichiae in three species of lemurs from St. Catherines Island, Georgia, USA. **J. Zoo. Wildl. Med.**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 503-509, 2004.

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 Zoo. Dis.**, Larchmont, v. 5, n. 4, p. 351-362, 2005.

YABSLEY, M. J. Natural History of *Ehrlichia chaffeensis*: Vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, sep., 2009.