

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

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES  
TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM AVES CARNÍVORAS**

**Ana Beatriz Vieira Sacchi**  
**Médica veterinária**

**2015**

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

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES  
TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM AVES CARNÍVORAS**

**Ana Beatriz Vieira Sacchi**

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

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva

2015

S119d Sacchi, Ana Beatriz Vieira  
Diagnóstico sorológico e molecular de agentes transmitidos por artrópodes em aves carnívoras / Ana Beatriz Vieira Sacchi. – Jaboticabal, 2015  
ix, 75 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Rosângela Zacarias Machado

Banca examinadora: Cristiane Divan Baldani, Carlos Termignoni, Marcos Rogério André e Cristina Harumi Adania

Bibliografia

1. Agentes Anaplasmataceae. 2. Bartonellaceae. 3. Haemosporida. 4. Aves carnívoras. 5. Diagnóstico sorológico. 6. Diagnóstico molecular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.159:636.5

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

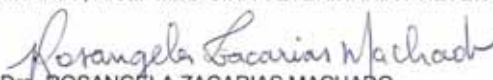
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM AVES CARNÍVORAS

**AUTORA:** ANA BEATRIZ VIEIRA SACCHI

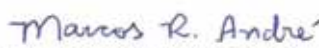
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. CRISTIANE DIVAN BALDANI  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Seropédica/RJ

  
Prof. Dr. CARLOS TERMIIGNONI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Porto Alegre/RS

  
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. CRISTINA HARUMI ADANIA  
Associação Mata Ciliar / Jundiaí/SP

Data da realização: 03 de junho de 2015.

## **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 Primeiro 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 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, obtendo o título de Mestre na referida área. Em agosto de 2011, ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal– SP, novamente sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado. Atualmente ocupa o cargo de Assistente Agropecuário II, na Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

## DEDICATÓRIA

À amizade... Não há sonhos que se realizem sem esta  
manifestação do amor...

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor da Vida, pela paciência em nos ensinar a viver;

À minha família, que se tornou maior... Ao meu amor, Guilherme Furquim Bernardes... Obrigada, queridos, pelo amor, apoio, paciência e compreensão. Eu amo vocês...

À 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;

Aos professores membros da Banca de Qualificação e Defesa: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Zacarias Machado, Prof. Dr. Marcos Rogério André, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Werther, Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, Prof. Dr. Carlos Termignoni, Dr<sup>a</sup>. Cristina Harumi Adania, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiane Divan Baldani... Obrigada pelo auxílio na correção deste trabalho e sugestões pertinentes ao contexto da discussão;

Aos colaboradores desta pesquisa, Dr<sup>a</sup>. Cristina Harumi Adania, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiane Divan Baldani, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Werther, Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira, além dos amigos Artur Gouveia Rocha e Itair Bessi (e família), pelo auxílio na captura das aves e colheita das amostras;

Aos amigos presentes e aqueles que já passaram pelo Departamento de Patologia Veterinária (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 aos queridos amigos Márcia Jusi, Rafaela Beraldo, Carla Freschi, Keyla Sousa, Luiz Ricardo Gonçalves, Marcos Rogério André, Juliana, Aline e Pedro (Ambulatório de Animais Selvagens da FCAV – UNESP - Jaboticabal):

obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, bondade, dedicação e amizade, de sempre; não há palavras no mundo que possam expressar minha gratidão a vocês;

Aos amigos de jornada, pelo apoio e amizade constantes; muita obrigada, minha querida Scheilla Bolonhezi Verdade e sua família, André e Ana Lúcia, Michele e Marcelo, D. Regina e S. Osvaldo, eu amo vocês;

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

À Fapesp, pelo suporte financeiro ao projeto (Processo nº 2012/11870-3).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal

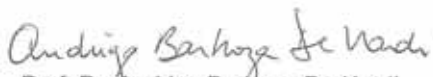


## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 004153/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes vetores em aves carnívoras no Brasil**", sob a responsabilidade da Profª Drª Rosângela Zacarias Machado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de março de 2012.

Jaboticabal, 06 de março de 2012.

  
Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi  
Coordenador - CEUA

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Infecções por agentes da Ordem Rickettsiales.....	03
2.1.1. Agentes etiológicos e transmissão.....	03
2.1.2. Agentes Anaplasmataceae e as Aves.....	06
2.1.3 Agentes Anaplasmataceae e infecções humanas.....	09
2.2. Infecções por agentes da Ordem Rhizobiales: <i>Bartonella</i> spp.....	10
2.2.1. Agentes etiológicos e transmissão.....	10
2.2.2. <i>Bartonella</i> spp. e Infecções Animais.....	11
2.2.3. <i>Bartonella</i> spp. e Infecções Humanas.....	11
2.3. Infecções por agentes da Ordem Haemosporida.....	12
2.3.1 Agentes etiológicos e transmissão.....	12
2.3.2. Aves e Infecções por <i>Plasmodium</i> spp, <i>Haemoproteus</i> spp. e <i>Leucocytozoon</i> spp.....	13
2.3.3. Ordem Haemosporida e infecções humanas.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo.....	16
4.2. Métodos de Captura.....	16

4.3. Colheita das amostras.....	21
4.4. Pesquisa de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos.....	22
4.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	22
4.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
4.6.1. Extração de DNA.....	23
4.6.2. PCR em Tempo Real (qPCR).....	24
4.6.3. PCR Convencional.....	25
4.6.3.1. Reações de Amplificação.....	25
4.6.3.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	28
4.6.3.3. Extração e Purificação das amostras.....	28
4.6.4. Sequenciamento.....	29
4.6.5. Análise das sequências e construção das árvores filogenéticas.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Presença de Ectoparasitas.....	30
5.2. Avaliação dos esfregaços sanguíneos.....	31
5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	31
5.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	33
5.5. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR).....	39
5.6. Análise das sequências.....	43
5.7. Árvores Filogenéticas.....	44
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados na qPCR multiplex para os gêneros <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Bartonella</i> spp. (ANDRÉ, 2012).....	25
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores, genes alvo e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados nas qPCRs para <i>E. chaffeensis</i> e <i>A. phagocytophilum</i> (RELLER et al., 2010).....	25
<b>Tabela 3.</b> Espécies e origem das aves positivas na qPCR para <i>Anaplasma</i> spp. (gene <i>groE</i> ).....	35

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Espécies e número de aves amostradas, incluindo local da captura e período de amostragem, assim como presença ou ausência de ectoparasitas, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil.....19
- Quadro 2.** Descrição dos oligonucleotídeos Iniciadores para as reações de PCR e nested PCR, tamanho do amplímero (pb), sequência térmica e referências utilizadas, relacionados a cada agente pesquisado (agentes Anaplasmataceae gene alvo 16SrRNA; hemosporídeos , gene alvo citocromo B).....27
- Quadro 3.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do amplímero (pb), sequência térmica e referências, utilizados nas reações de PCR e nested PCR realizadas apenas para amostras previamente positivas na qPCR para o gene *groESL* e PCR convencional para o gene *16SrRNA* (*Ehrlichia* spp/ *Anaplasma* spp.).....28
- Quadro 4.** Resumo dos resultados positivos, indicando a espécie da ave, local de colheita da amostra e a positividade/ negatividade para os vários testes realizados.....42
- Quadro 5.** Identidade pelo Blast dos amplímeros sequenciados.....43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Captura de exemplar macho da espécie *Falco sparverius* em Jaboticabal - SP.....18
- Figura 2.** Gavião Carijó (*Rupornis magnirostris*) jovem, capturado com auxílio da bal-chatri, em Descalvado – SP.....18
- Figura 3.** Armadilha improvisada em antiga pocilga em propriedade rural no município de Santa Ernestina - SP, para captura de urubus (*Coragyps atratus*) – A. Vista lateral; B. Vista Interna.....20
- Figura 4.** Contenção de *Tyto alba* para colheita de sangue, na Associação Mata Ciliar – Jundiá – SP.....22
- Figura 5.** Gavião Carijó (*R. magnirostris*) recém capturado em Descalvado – SP, evidenciando a presença de uma ninfa ingurgitada de *Amblyomma* spp. na proximidade da abertura nasal esquerda.....31
- Figura 6.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de cervo-do-Pantanal) para *A. phagocytophilum*. Em A, são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B, não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 400X e 1000X, respectivamente.....32
- Figura 7.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de cervo-do-Pantanal) para *Ehrlichia chaffeensis*. Em A são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 1000X.....33
- Figura 8.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de felino) para *Ehrlichia canis*. Em A são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 1000X.....33

- Figura 9.** Resultados da qPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (gene alvo *groE*; linhas azul e violeta, respectivamente). Em A, são evidenciadas amostras positivas para *Anaplasma* spp. do lado direito e inferior do quadro. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.....34
- Figura 10.** Resultados da qPCR realizada para *E. chaffeensis* (gene alvo *vlpt*) (linha azul). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.....36
- Figura 11.** Resultados da qPCR realizada para *A. phagocytophilum* (gene alvo *msp-2*) (linha violeta). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.....37
- Figura 12.** Resultados da qPCR realizada para *Bartonella* spp. (gene alvo *nuoG*) (linha vermelha). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.....38
- Figura 13.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 410 pb, na PCR para *E. chaffeensis* (gene *16SrRNA*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1: controle positivo (410 pb); Canaleta 29: branco; Canaletas 2, 3, 11, 18 e 23: amostras PCR positivas.....39
- Figura 14.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 358 pb, na PCR para *E. canis* (gene *16SrRNA*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 1: controle positivo (358 pb); Canaleta 7: branco; Canaletas 4 e 5: amostras PCR positivas.....40

- Figura 15.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (gene *citocromo B*). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 2: controle positivo; Canaleta 16: branco; Canaletas 2, 3, 9 e 14: amostras PCR positivas.....40
- Figura 16.** Posição filogenética de sequências de *Ehrlichia* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em sequências de DNA do gene *16SrRNA*. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.....45
- Figura 17.** Posição filogenética de sequências de *Haemoproteus* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.....46
- Figura 18.** Posição filogenética de sequências de *Plasmodium* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em sequências de DNA do gene mitocondrial *citocromo b*. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 45 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.....47

## DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES EM AVES CARNÍVORAS

**RESUMO** - Agentes das Ordens Rickettsiales, Haemosporida e Rhizobiales são causadores de enfermidades que acometem várias espécies animais, podendo representar um risco à saúde dos mesmos, inclusive de seres humanos. Aves carnívoras podem infestar-se e infectar-se com muitas espécies de parasitas, incluindo-se carrapatos e hemoparasitas, sendo os hábitos de predação fatores de favorecimento à transmissão e translocação de diversos agentes etiológicos. O objetivo deste estudo foi pesquisar, por meio de métodos indiretos (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI) e diretos (esfregaços sanguíneos, PCR em Tempo Real e PCR Convencional) os agentes das Famílias Anaplasmataceae (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*), Bartonellaceae (*Bartonella* spp.) e Ordem Haemosporida (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) em ectoparasitas e amostras de sangue de aves carnívoras, realizando-se um estudo filogenético dos agentes encontrados. Para tanto, procedeu-se à colheita de 121 amostras de sangue total e 88 amostras de soro de aves pertencentes às Ordens Accipitriformes, Falconiformes, Strigiformes e Cathartiformes, capturadas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Em relação aos ectoparasitas, foram recolhidas três larvas e uma ninfa ingurgitada de carrapatos do gênero *Amblyomma* de um gavião carijó (*Rupornis magnirostris*) no Estado de São Paulo. Na RIFI para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, 03 (3,41%) e 05 (5,68%) amostras apresentaram sororreatividade, respectivamente. Todas as amostras testadas na RIFI para *E. canis* mostraram-se negativas. Na avaliação de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, não foram encontradas estruturas compatíveis com hemoparasitas. Em relação a PCR em Tempo Real (qPCR), não foram encontrados animais PCR positivos para *Ehrlichia chaffeensis* (gene *vlpt*) e *Anaplasma phagocytophilum* (gene *msp-2*). Na qPCR Multiplex para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. (gene *groE*) e *Bartonella* spp. (gene *nuoG*) observamos 12 amostras positivas para *Anaplasma* spp. (9,91%). Na PCR convencional baseada no gene *16SrRNA* de *Anaplasmataceae* e no gene *citocromo B* para *hemosporídeos*, oito aves foram PCR positivas para *Ehrlichia* spp (6,61%, sendo cinco na PCR para *E. chaffeensis* e três na PCR para *E. canis*), três para *Haemoproteus* spp (2,48%) e uma para *Plasmodium* spp (0,83%). Na análise filogenética, quatro amostras de *Ehrlichia* spp. posicionaram-se no mesmo ramo de *Ehrlichia* identificadas em animais selvagens no Brasil e de um isolado humano nos EUA. Para os agentes estudados, a diversidade genética entre as linhagens dos hemoparasitas em estudo interferem enormemente no diagnóstico específico, sobretudo quando apenas é utilizado o diagnóstico molecular. Apesar da baixa frequência de aves infectadas pelos referidos patógenos e infestadas por carrapatos, as aves carnívoras estão expostas à infecção por agentes da Família Anaplasmataceae e Ordem Haemosporida, podendo carregá-los em seu habitat.

**Palavras-chave:** Agentes Anaplasmataceae, Haemosporida, Bartonellaceae, aves carnívoras, diagnóstico sorológico e molecular.

## SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF AGENTS TRANSMITTED BY ARTHROPODS IN CARNIVOROUS BIRDS

**ABSTRACT** - Rickettsiales, Haemosporida and Rhizobiales agents cause diseases that affect various animal species, including humans. Carnivorous birds become infested and infected with many species of parasites, including ticks and hemoparasites, and the predation habits favoring transmission and translocation of various etiological agents. The aim of this study was to investigate, using indirect methods (Immunofluorescence - IFAT) and direct methods (blood smears, Real-Time PCR and Conventional PCR) agents of Families Anaplasmataceae (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*), Bartonellaceae (*Bartonella* spp.) and Haemosporida Order (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*) in ectoparasites and blood samples carnivorous birds, performing a phylogenetic study of these agents. Therefore, we collected 121 blood samples and 88 serum samples from birds belonging to the Accipitriformes, Falconiformes, Strigiformes and Cathartiformes Orders, captured in the states of São Paulo and Rio de Janeiro. Regarding the ectoparasites, we collected three larvae and one engorged nymphal *Amblyomma* ticks of a *Rupornis magnirostris* in São Paulo. At IFAT for *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum*, 03 (3.41%) and 05 (5.68%) samples showed seroreactivity, respectively. Blood smears stained by Giemsa were analyzed and hemoparasites were not found. Regarding the Real-Time PCR (qPCR), in multiplex qPCR for *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. (*groE* gene) and *Bartonella* spp. (*nuoG* gene) observed 12 samples positive for *Anaplasma* spp. (9.91%). In conventional PCR-based *16SrRNA* gene for Anaplasmataceae and *cytochrome B* gene for hemosporidia, eight birds were PCR positive for *Ehrlichia* spp (6.61%, five in PCR for *E. chaffeensis* and three in PCR for *E. canis*), three for *Haemoproteus* spp (2.48%) and *Plasmodium* spp (0.83%). In phylogenetic analysis, four samples of *Ehrlichia* spp. positioned on the same branch *Ehrlichia* identified in wild animals in Brazil and the US human isolate. The genetic diversity between strains of hemoparasites in these study interfere greatly in the specific diagnosis. Despite the low frequency of birds infected by these pathogens and infested with ticks, carnivorous birds are exposed to infection by agents of Anaplasmataceae Family and Haemosporida Order, and may carrea them in their habitat.

**Keywords:** Anaplasmataceae agents, Haemosporida, Bartonellaceae, carnivorous birds, serological and molecular diagnosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos séculos, o ambiente terrestre tem sofrido uma série de transformações, evidenciadas no avanço das fronteiras agrícolas e monoculturas, alterações climáticas, modificações nas relações parasita-hospedeiro e reemergência ou introdução de patógenos. Indubitavelmente, os efeitos dessas alterações são maiores sobre animais que competem diretamente com o homem por habitat, afetando drasticamente a ecologia das doenças nos ecossistemas bem como a saúde global das populações humana e animal.

Nesse contexto, as aves apresentam grande potencial na dispersão de patógenos, uma vez que muitas espécies apresentam hábitos migratórios, grande facilidade de locomoção e amplo território, o que permite que entrem em contato com animais e vetores infectados, fazendo translocação de agentes etiológicos. Para algumas espécies de aves carnívoras, o hábito de predação favorece a infestação por ectoparasitas e a infecção por endoparasitas, devido ao contato com solo e vegetação local, além de contato íntimo e ingestão de vísceras das presas.

No Brasil, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar o papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças causadas por agentes das Ordens Rickettsiales, Rhizobiales e Haemosporida. Para alguns agentes Rickettsiales, como *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae), foi realizada a detecção do DNA dos patógenos em várias espécies animais, incluindo aves carnívoras. Análises filogenéticas apontaram tratar-se de agentes filogeneticamente próximos a *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*, respectivamente.

*Bartonella* spp. (Rhizobiales: Bartonellaceae) também é considerado um patógeno negligenciado e reemergente, sendo que hoje são descritas mais de 40 espécies e subespécies responsáveis por um grande número de doenças infecciosas em humanos e animais. No Brasil, há relatos da infecção em cães, gatos, felinos selvagens e humanos, sendo que os artrópodes vetores das enfermidades são representados por mosquitos, pulgas, e também carrapatos. Recentemente, o DNA de *Bartonella henselae* e *B. koehlerae* foi identificado em amostras de sangue de aves no

Estado da Carolina do Norte, Estados Unidos. Ainda, DNA de *B. grahamii* foi identificado em carrapato recolhido de uma ave, na Coréia.

Além do aspecto zoonótico considerado, doenças infecciosas emergentes que afetam aves selvagens parecem aumentar em número e têm levado a reduções localizadas de populações, e até mesmo extinções de espécies. Considerando os fatores previamente mencionados, como os impactos ambientais das atividades humanas, mudanças climáticas e, portanto, alterações nas populações de vetores e translocação de patógenos, a conservação de espécies ameaçadas torna-se mais difícil de ser realizada, pois a reprodução é prejudicada. Nesse contexto, descobriu-se recentemente que a infecção crônica causada pelos hemosporídeos (Haemosporida: Plasmodiidae, Haemoproteidae) representados pelos agentes *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., promove o encurtamento dos telômeros, e então as células morrem, acumulando danos nos tecidos e provocando disfunções nos órgãos. Esses fatores reduzem o tempo de vida das aves, interferindo no sucesso reprodutivo e na propagação da espécie.

Assim, com o advento da biologia molecular, em particular o uso da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), tornou-se possível realizar uma investigação mais aprofundada a respeito das enfermidades transmitidas por artrópodes e seus reservatórios selvagens e domésticos, bem como os efeitos que essas doenças causam em seu hospedeiro. Estudos que determinam a prevalência desses patógenos auxiliam no entendimento da epidemiologia das enfermidades, e contribuem enormemente à proteção à saúde pública e à saúde de animais domésticos e selvagens.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Infecções por agentes da Ordem Rickettsiales

#### 2.1.1. Agentes etiológicos e transmissão

Uma reclassificação da Ordem Rickettsiales dividiu a mesma em duas famílias: Rickettsiaceae (gêneros *Rickettsia* e *Orientia*) e Anaplasmataceae (gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*). Assim, as espécies antes denominadas *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia bovis* foram agrupadas no gênero *Anaplasma*; *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *Cowdria ruminantium* no gênero *Ehrlichia*; *E. sennetsu* e *E. risticii* no gênero *Neorickettsia*; e *Wolbachia pipientis* no gênero *Wolbachia* (DUMLER et al., 2001).

Agentes Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, de formato cocóide ou elipsoidal, que causam doenças nos animais e no homem. Compreendem espécies filogeneticamente relacionadas, porém genética e antigenicamente diferentes (YU et al., 2006), cujos ciclos biológicos são compostos por interações entre vetores invertebrados (principalmente carrapatos) e hospedeiros vertebrados (WALKER e DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003).

Nos EUA, *Ehrlichia chaffeensis* (agente etiológico da erliquiose monocítica humana) tem como seus principais vetores os carrapatos das espécies *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes pacificus*. É encontrada parasitando veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), o mais importante hospedeiro das formas adulta e imaturas de *Amblyomma americanum* (LOCKHART et al., 1997), além de cães, coiotes e cabras neste mesmo país (WALKER et al., 2008). Além disso, raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), guaxinins (*Procyon lotor*), gambás (*Didelphis* sp.) e roedores (*Neotoma fuscipes*, *Sciurus griseus*, *Peromyscus* spp.) podem também servir como hospedeiros para todos os estágios de *Amblyomma americanum* (PADDOCK & CHILDS, 2003), o que sugere que eles possam estar envolvidos na manutenção natural de *E. chaffeensis*. No Brasil, *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próxima a *E. chaffeensis* foi detectada em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (MACHADO et al., 2006;

SACCHI et al., 2012) e aves carnívoras (MACHADO et al., 2012). Suspeita-se que a transmissão desta bactéria entre os cervos, no Brasil, seja realizada pelo carrapato *Amblyomma triste* (SACCHI et al., 2012).

Além de *E. chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* também é transmitida pela picada do carrapato *A. americanum*, sendo encontrada parasitando veados-de-cauda-branca e cães nos EUA (WALKER et al., 2008). No continente asiático, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* são descritos infectando roedores na China e na Coreia, sendo que *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor silvarum* e *Haemaphysalis* spp. são apontados como transmissores desses agentes (CAO et al., 2006; WEN et al., 2003; KIM et al., 2006).

Em relação a *E. canis*, o principal mecanismo de transmissão natural no cão é pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que, no repasto sanguíneo, inocula a bactéria nos animais (EWING, 1969). O carrapato se infecta ingerindo sangue contendo a bactéria, a qual é capaz de se multiplicar nos hemócitos, nas células das glândulas salivares e do intestino (SMITH et al., 1976). A transmissão ocorre de forma transestadial e não transovariana (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976).

As erlíquias infectam leucócitos mononucleares, formando um agrupado de estruturas de formato cocóide ou elipsoidal. Estas inclusões citoplasmáticas em agrupamento são denominadas mórulas (RISTIC e HUXSOLL, 1984). O ciclo de desenvolvimento de *Ehrlichia* spp. na célula hospedeira inicia-se com a adesão de pequenas células densamente coradas (CD), as quais acabam por penetrar na célula hospedeira. Dentro de um vacúolo nesta última, as células-densas se transformam em células reticuladas (CR), as quais se multiplicam por divisão binária em cerca de 48 horas e, então, após 72 horas de infecção, maturam e se transformam em células-densas novamente. Estas, por sua vez, são liberadas da célula hospedeira e recomeçam um novo ciclo de infecção (ZHANG et al., 2006).

*Anaplasma platys*, descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1978 (HARVEY et al., 1978), infecta especificamente plaquetas de cães e causa uma doença denominada trombocitopenia infecciosa cíclica canina. Sacchi et al (2012) relata que a análise filogenética de *Anaplasma* spp identificados em cervos-do-pantanal aponta que

este agente está mais relacionado a *Anaplasma platys* do que a outras espécies de *Anaplasma*, podendo indicar a ocorrência de variedades genéticas do agente no meio selvagem. Não é conhecida a patogenicidade do agente para os cervídeos, nem mesmo os vetores envolvidos, o que motiva maiores investigações sobre a ocorrência deste agente no meio selvagem.

Já *Anaplasma phagocytophilum* (agente etiológico da anaplasmoose granulocítica animal e humana) é transmitido pelos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* nos EUA, tendo como principais hospedeiros o veado-de-cauda-branca, cães, equinos, esquilos, alces e roedores. Na Europa, *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), além de equinos, bovinos, gatos e ovelhas (WALKER et al., 2008). No Brasil, *Anaplasma* spp. filogeneticamente próximo a *A. phagocytophilum* foi detectado recentemente em cães no estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011), aves carnívoras (MACHADO et al., 2012), gatos domésticos e carnívoros selvagens em cativeiro (ANDRÉ et al., 2014; ANDRÉ et al., 2012) e cervídeos (SILVEIRA et al., 2014).

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

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. helminthoeca* e *N. sennetsu*, *N. risticii* também apresente padrão de transmissão envolvendo a ingestão de trematódeos aquáticos e caramujos (PUSTERLA et al., 2000;

DUMLER et al., 2001). Nos EUA, existem 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 sul do Brasil, foram 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 (2005) identificaram caramujos do gênero *Heleobia* albergando cercárias PCR positivas para *N. risticii*.

### **2.1.2. Agentes Anaplasmataceae e as Aves**

Pouco é relatado a respeito da ocorrência de agentes Anaplasmataceae em aves selvagens bem como qual papel desempenham estes animais no ciclo das enfermidades causadas pelos referidos patógenos. Estudos de patogenicidade dos agentes e tratamento das enfermidades têm sido explorados intensivamente, mas vários aspectos epidemiológicos das doenças se mantêm, em muitas regiões, especulativo. Assim, os possíveis hospedeiros para os patógenos e os ciclos naturais de transmissão ainda não foram totalmente estabelecidos.

A investigação de potenciais hospedeiros para agentes Anaplasmataceae é de significativa importância, dado seu potencial zoonótico e os relatos de ocorrência destes agentes em várias espécies animais, como no caso de anfíbios (DAVIS et al., 2009), répteis (VÁCLAV et al., 2011) e aves (BJÖERSDORFF et al., 2001; DANIELS et al., 2002; OGDEN et al., 2008).

Durante uma migração, várias espécies de aves se estabelecem em determinadas localidades para efetuar mudas de penas, para se alimentar ou nidificar, permanecendo nesses locais por períodos variáveis de tempo. Tal comportamento favorece o contato com ectoparasitas do local, especialmente ácaros e carrapatos, os quais, por sua vez, podem ser transportados por longas distâncias, e assim, novos focos de doenças relacionadas a este parasitismo podem ser estabelecidos ao longo das rotas migratórias (BJÖERSDORFF et al., 2001). Em relação às aves carnívoras, o hábito de predação de algumas espécies favorece a infestação por ectoparasitas e a

infecção por endoparasitas, devido ao contato íntimo com a presa e ingestão de vísceras da mesma.

Segundo Daniels et al. (2002), torna-se necessário identificar as espécies de aves que poderiam atuar como reservatórios do agente da anaplasmoze granulocítica humana (HGE) e de outros agentes potencialmente causadores de zoonoses, tais como *Rickettsia* spp., assim como os padrões de movimento destas aves nas migrações sazonais, tanto de curta distância quanto as que abrangem grandes extensões territoriais. Estes autores ainda sugerem que, pelo menos duas espécies de aves americanas o *Turdus migratorius* e o *Catharus fuscescens* possam atuar como reservatórios de *A. phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi*, sendo fonte de infecção para *Ixodes scapularis*.

Na Suécia, estudo envolvendo 3.054 aves migratórias de 56 espécies diferentes, relatou uma frequência de 2,4% de aves parasitadas com *I. ricinus*, sendo que 5,4% mostraram positivos na PCR para *Ehrlichia* spp., detectada pela PCR (BJÖERSDORFF et al., 2001). Os autores afirmam que o papel reservatório das aves para *Ehrlichia* spp. ainda não está totalmente esclarecido e sugerem que as aves poderiam atuar tanto como reservatório dos agentes, como transportadoras de vetores de uma região para outra, o que ressalta a importância destes animais na epidemiologia das erliquioses. Em Nova York, EUA, 20% dos “pools” de larvas de *I. scapularis* coletados de aves mostraram-se positivos para *A. phagocytophilum*, 12 % para *Borrelia burgdorferi* e 4% para ambos os agentes, o que segundo os autores demonstra coinfeção. Os autores, no entanto, não descartam a possibilidade da ocorrência de *cofeeding* (coalimentação), em que as ninfas antes presentes nas aves poderiam ter transmitido os patógenos às larvas, num mesmo sítio de alimentação (DANIELS et al., 2002).

Na Itália, o DNA de *A. phagocytophilum*, *Borrelia garinii* e *Borrelia valaisiana* foi detectado em exemplares de *I. ricinus* coletados em uma área de reprodução de aves. Os autores sugerem importante papel das aves como reservatórios destes agentes (MANNELLI et al., 2003). Neste mesmo país, Toma et al. (2014) identificaram, por meio da PCR, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Ehrlichia* spp., *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi* e *Babesia microti* em carrapatos recolhidos de aves migratórias. No

Canadá, foi detectado DNA de *A. phagocytophilum* e *Borrelia* sp. em carrapatos (*I. scapularis*) de aves migratórias pertencentes a 17 espécies diferentes, que migravam a partir do norte dos EUA, evidenciando a dispersão dos agentes e podendo representar um risco à Saúde Pública (OGDEN et al. 2008). Já na Alemanha, foram detectados também molecularmente, *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em 4,7%, 2,6% e 7,3%, respectivamente, nos 191 exemplares de *I. ricinus* provenientes de 99 pássaros (pertencentes a 11 espécies diferentes) presentes numa ilha de conservação no mar Báltico (HILDEBRANDT et al., 2010).

Johnston et al. (2013), em um estudo de infecção experimental, relataram que *Turdus migratorius* e *Dumetella carolinensis* podem se infectar com e, em seguida, transmitir *A. phagocytophilum* aos carrapatos. Observaram que um exemplar de *Turdus* infectou duas de 13 larvas de carrapatos em repasto sanguíneo no dia sete pós-infecção. As aves, porém, não desenvolvem bacteremia, anticorpos específicos ou doença grave, mas os camundongos controle se tornaram bacterêmicos e apresentaram soroconversão. Estes resultados sugerem que estas duas espécies de aves não desempenham um papel significativo na manutenção do agente da HGE e que pesquisas envolvendo sorologia em aves podem não representar um indicador confiável de exposição ao *A. phagocytophilum*. Por outro lado, Lommano et al. (2014), na Suíça, relataram que aves do gênero *Turdus* foram as mais parasitadas por carrapatos, e também aquelas que carregavam maior número de carrapatos PCR positivos aos agentes estudados (*A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp). Os autores também afirmam que de acordo com a infecção detectada em larvas de carrapatos sobre as aves, *Turdus merula* e *Anthus trivialis* podem ser considerados reservatórios para *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. e *A. phagocytophilum*. Nesse estudo, apesar de a taxa de infecção das larvas que se alimentaram juntamente com as ninfas (16,3%) ser muito semelhante a taxa de infecção das larvas que se alimentaram sem a presença de ninfas (17,9%) no hospedeiro, não foi descartada a possibilidade da ocorrência de *co-feeding* (coalimentação). Os autores levantaram a possibilidade de que as ninfas deixaram o hospedeiro antes da captura do mesmo, mas efetuaram a infecção de larvas previamente.

Ainda, o DNA de *Anaplasma* spp. foi detectado em amostras de sangue de aves silvestres no Chipre, Grécia (IOANNOU et al., 2009). No Brasil, Machado et al. (2012) relataram a identificação de *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próxima a *E. chaffeensis* e *E. canis* e *Anaplasma* spp. filogeneticamente próximo a *A. phagocytophilum* em *Polyborus plancus*, *Coragyps atratus* e *Falco sparverius*.

### 2.1.3. Agentes Anaplasmataceae e infecções humanas

Infecções humanas por organismos da família Anaplasmataceae foram primeiramente reconhecidas em 1953, inicialmente com *Neorickettsia sennetsu*. Em 1986, 1990 e 1998 foram reconhecidas as infecções causadas por *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia ewingii* em seres humanos (DUMLER et al., 2007).

Evidências sorológicas da exposição humana à *E. chaffeensis*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* foram relatadas no Brasil e na Venezuela (ARRAGA-ALVARADO et al., 1996; GALVÃO et al., 2002; CALIC et al., 2004). No Brasil, anticorpos para *E. chaffeensis* (GALVÃO et al., 2002) e DNA de *E. ewingii* (OLIVEIRA et al., 2008) foram detectados em cães no Estado de Minas Gerais, onde casos suspeitos de erliquiose monocítica humana foram relatados (CALICI et al., 2004; COSTA et al. 2005; COSTA et al., 2006). Na Venezuela, PEREZ et al. (2006), utilizando PCR para o gene 16SrRNA, relataram a ocorrência de infecção humana por *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próxima *E. canis*, em pacientes com sintomatologia clínica compatível com erliquiose. A infecção em humanos, no entanto, pode cursar assintomática, e mesmo assim, o DNA de agentes Anaplasmataceae pode ser identificado no sangue (BREITSCHWERDT et al., 2014). Vale ressaltar que as técnicas de detecção de anticorpos anti-agentes Anaplasmataceae não são específicas e, apenas por técnicas moleculares, principalmente pela amplificação de fragmentos de vários genes e sequenciamento das amostras, a detecção específica de cada agente pode ser alcançada.

Desde o primeiro reconhecimento e implementação de métodos de diagnóstico para a infecção humana por *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *A. phagocytophilum*, o número

de casos reportados 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 serão identificados. Com o aumento do diagnóstico das enfermidades, constatou-se que as mesmas podem se manifestar de forma severa, com aproximadamente metade dos pacientes requerendo hospitalização por complicações incluindo dificuldade respiratória, miocardite, acometimento neurológico, 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).

## **2.2. Infecções por agentes da Ordem Rhizobiales: *Bartonella* spp.**

### **2.2.1. Agentes etiológicos e transmissão**

A bartonelose, uma enfermidade zoonótica reemergente, é causada por uma bactéria hemotrópica, gram-negativa, aeróbica, e intracelular facultativa, sendo transmitida por artrópodes hematófagos ou mordedura e arranhadura de animais, principalmente gatos. As *Bartonella* spp. são bactérias classificadas no subgrupo alfa-2 da classe Proteobacteria e pertencentes à ordem Rhizobiales. Fazem parte da família Bartonellaceae e mantêm uma relação filogenética remota com os membros da Ordem Rickettsiales (CHOMEL et al., 2003; DEHIO, 2004).

Das 31 espécies de *Bartonella* spp. descritas, pelo menos 17 têm sido associadas com infecções humanas, sendo que várias espécies têm sido identificadas em animais domésticos e selvagens, incluindo canídeos, veados, bovinos, roedores e até mesmo tartarugas marinhas. Para várias espécies de *Bartonella* o vetor é conhecido, como por exemplo: *B. henselae*, *Ctenocephalides felis*; *B. quintana*, *Pediculus humanus corporis*, e *B. bacilliformis*, *Lutzomyia verrucarum*. *Bartonella* spp. também tem sido detectada, por meio da PCR, em carrapatos das espécies *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus*, *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus* (MOLIN et al., 2011), além de pulgas parasitas de humanos (*Pulex irritans*)

e moscas parasitas de veados (*Lipoptena cervi*, *Lipoptena mazamae*) (KRUSZEWSKA et al, 1996; DEHIO, 2004; HALOS et al., 2004; REEVES et al., 2006; SRETER-LANCZ et al., 2006; SUN et al., 2008; TSAI et al., 2011 citados por PITASSI, 2013).

### **2.2.2. *Bartonella* spp. e Infecções Animais**

Os seres humanos e outros animais, como gatos, cães, veados, leões, coelhos, roedores, golfinhos, ruminantes e até tartarugas marinhas são considerados reservatórios para espécies de *Bartonella* (MCGILL et al., 2005; VALENTINE et al., 2007; MOSEPELE et al, 2012;; TAY et al., 2014). Assim, no Brasil e em todo o mundo, são relatadas infecções por *Bartonella* spp. em felídeos e canídeos, domésticos ou selvagens, cativos ou de vida livre (MOKHTAR & TAY, 2011, ANDRÉ et al., 2014).

Estudos científicos sugerem que algumas espécies de aves selvagens, por carregarem carrapatos infectados com vários patógenos, atuam também na manutenção e disseminação de *Bartonella* spp. A região espaçadora intergênica (ITS) de *Bartonella grahamii* foi detectada, por meio da técnica de nested PCR, em *Ixodes turdus* coletado de uma ave (*Zoothera aurea*), na Coreia (KANG et al., 2013). Já Mascarelli et al. (2014) relataram a identificação do DNA de duas espécies patogênicas de *Bartonella* spp (muito semelhantes a *B. henselae* e *B. koehlerae*) no sangue de aves migratórias, pertencentes à 19 espécies diferentes, na Carolina do Norte, Estados Unidos.

Por outro lado, Molin et al. (2011), na pesquisa molecular da mesma bactéria, em carrapatos (principalmente *Hyalomma rufipes*) recolhidos de aves migratórias em ilhas no Mediterrâneo, não encontrou carrapatos infectados com *Bartonella* spp. De forma semelhante, Toma et al (2014) em pesquisa do DNA de *Bartonella* spp. em carrapatos de aves migratórias na região central da Itália, também não obtiveram positivos para o agente em questão.

### **2.2.3. *Bartonella* spp. e Infecções Humanas**

As espécies de *Bartonella* são relacionadas a quatro doenças bem conhecidas: doença de Carrión, febre das trincheiras, doença da arranhadura do gato e angiomatose bacilar (DEHIO, 2004; LIU et al., 2012).

Clinicamente, as espécies de *Bartonella* mais importantes e que são associadas ao maior número de doenças em seres humanos são a *B. bacilliformis* (agente da febre de Oroya e da verruga peruana), a *B. henselae* (agente da doença da arranhadura do gato, da angiomatose bacilar, da peliose bacilar hepática, de endocardite e de septicemia) e a *B. quintana* (agente da febre das trincheiras, da angiomatose bacilar, de bacteremia e de endocardite) (ANDERSON & NEUMAN, 1997; DEHIO, 2004; LIU et al., 2012 citados por PITASSI, 2013). A *B. henselae* e a *B. quintana* estão relacionadas com a maioria das taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunodeficientes e a *B. henselae* é a espécie mais frequentemente associada a doenças humanas (KOEHLER et al., 2003; HARMS & DEHIO, 2012). Estas espécies causam um espectro de doenças específicas em hospedeiros imunodeficientes, causando febre, endocardite com cultura negativa, osteomielite e lesões angioproliferativas mais frequentes na pele, fígado e baço (MOSEPELE et al., 2012). Febre persistente, fadiga crônica e bacteremia assintomática também têm sido detectadas em pessoas infectadas pela *B. henselae* (HARMS & DEHIO, 2012). No Brasil, alguns relatos chamam a atenção para a transmissão de *Bartonella* spp. via transfusão sanguínea, com risco de morte aos pacientes (MAGALHÃES et al., 2009).

O tratamento das bartoneloses depende da expressão clínica, do sistema imune do hospedeiro e da gravidade da doença. Algumas doenças causadas por *Bartonella* spp. podem ter resolução espontânea, mas, em outros casos, a doença pode ser fatal sem o uso de antibióticos adequados (ROLAIN et al., 2004).

## **2.3. Infecções por agentes da Ordem Haemosporida**

### **2.3.1. Agentes etiológicos e transmissão**

Parasitas hemosporídeos (Sporozoa: Haemosporida) são um grupo cosmopolita de protistas heteroxenos obrigatórios que parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos

e utilizam dípteros sugadores de sangue (Insecta: Diptera) como vetores. Taxonomistas descreveram mais de 200 espécies de hemosporídeos em mais de 100 espécies de aves, e os colocaram em quatro gêneros distintos, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*. Os vetores desses parasitas são exclusivamente insetos dípteros hematófagos (BRAGA et al., 2011).

Todos os quatro gêneros de parasitas têm ciclos de vida semelhantes, sendo que as diferenças residem basicamente na fase assexuada, no hospedeiro vertebrado.

### **2.3.2. Aves e Infecções por *Plasmodium* spp, *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.**

Hemosporídeos têm sido estudados desde 1884 e infecções por *Plasmodium* spp. em aves são considerados modelos importantes no estudo da malária humana.

Para as aves, declínio na produtividade e até alta mortalidade por essas infecções parasitárias têm sido relatadas. A maioria das infecções por parasitas do gênero *Haemoproteus* produz infecções subclínicas. Em alguns pássaros, anemia, anorexia e depressão foram observadas e há relatos de que algumas espécies deste parasita podem ser bastante virulentos e letais para algumas espécies de aves (ELAHI et al., 2014).

Já parasitas do gênero *Plasmodium* causam malária aviária, e podem ser bastante virulentos, sobretudo para hospedeiros “imunologicamente despreparados”, ou seja, que mantêm pouco ou nenhum contato com o parasita. Um dos impactos mais significativos das infecções por *Plasmodium* spp. sobre as aves hospedeiras ocorre a longo prazo sobre o sistema reprodutivo, acarretando decréscimo da população (LAPOINTE et al., 2012). *Leucocytozoon* normalmente provoca anemia e aumento do fígado e baço, e pode ser altamente patogênico em perus e patos (VALKIUNAS 2005; ELAHI et al., 2014).

No que se refere aos vetores, onde estes parasitas realizam a fase sexuada, *Plasmodium* spp. são transmitidos por várias espécies de mosquitos (Culicidae), de diferentes gêneros; *Haemoproteus*, em geral, é transmitido por moscas Hippoboscidae

e Ceratopogonidae; já a transmissão de *Leucocytozoon* é realizada por moscas Simuliidae e Ceratopogonidae (subgênero *Akiba*).

Até o momento, são conhecidas mais de vinte espécies de mosquitos anofelinos nos quais a esporogonia de *Plasmodium* spp. é completada. Assim, *Anopheles* spp. são vetores viáveis para *P. cathemerium*, *P. gallinaceum*, *P. lophurae*, *P. fallax*, and *P. relictum* (VALKIUNAS, 2005).

Descobriu-se recentemente que a infecção crônica causada pelos hemosporídeos representados pelos agentes *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., promove o encurtamento dos telômeros, e então as células morrem, acumulando danos nos tecidos e provocando disfunções nos órgãos. Esses fatores reduzem o tempo de vida das aves, interferindo no sucesso reprodutivo e na propagação da espécie (ASGHAR et al., 2015).

No Brasil, Bennett & Lopes (1980) pesquisaram a prevalência de hemosporídeos em cerca de 3500 aves provenientes de três regiões ou cidades do Estado de São Paulo: Itapetininga, Casa Grande e Guaratuba. No referido estudo, os pesquisadores obtiveram a prevalência de 0,9% de *Plasmodium* spp. em Guaratuba (a região mais abundante em hemoparasitas: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Trypanosoma*, microfilárias), e 1,8% de prevalência para o mesmo parasita em Itapetininga. Woodworth-Lynas et al. (1989) ampliaram o número de aves amostradas (15574 animais), porém também encontraram baixa prevalência de *Plasmodium* spp. (0,6%). Vale ressaltar que a técnica utilizada na pesquisa dos hemoparasitas em ambos os estudos citados foi unicamente a análise de esfregaços sanguíneos em microscopia de luz. Estudos que combinam a análise de esfregaços sanguíneos e PCR em geral obtém maior porcentagem de aves positivas, com prevalências que variam de 0 a 100% para *Plasmodium* spp. e 0 a 18,48% para *Haemoproteus* spp., em várias espécies de aves e diferentes regiões do Brasil (BUENO et al., 2010; LIMA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2005; BELO et al., 2009, citados por BRAGA et al., 2011).

Desta forma, estes parasitas são importantes na definição de estratégia de conservação das mais variadas espécies de aves selvagens, e estudos mais

aprofundados envolvendo prevalência da infecção nas aves e identificação de reservatórios e vetores devem ser conduzidos.

### **2.3.3. Ordem Haemosporida e infecções humanas**

O homem é o hospedeiro natural de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, mas não se infecta, em geral, com plasmódios de outros mamíferos, aves ou répteis, nem mesmo com parasitas dos gêneros *Leucocytozoon* e *Haemoproteus*. Entretanto, algumas espécies que causam malária em símios como *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. inui* e *P. knowlesi*, já foram implicadas em malária em humanos, tanto em infecções acidentais como em infecções naturais. Reciprocamente, em condições naturais, os plasmódios da malária humana só se desenvolvem no homem, com exceção do *P. malariae*, que infecta também algumas espécies de macacos (RAMASAMY 2014).

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo pesquisar em aves carnívoras e seus ectoparasitas, provenientes dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, a ocorrência de agentes Anaplasmataceae, Bartonellaceae e Haemosporida, utilizando métodos sorológicos e moleculares.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Capturar aves carnívoras nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro para obtenção de amostras de sangue, soro e ectoparasitas hematófagos (quando presentes) das mesmas;
- Determinar a ocorrência de ectoparasitas hematófagos nestas aves;

- Pesquisar a presença de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos de cada ave amostrada;
- Investigar a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia chaffeensis*, anti-*E. canis* e anti-*Anaplasma phagocytophilum* nas amostras de soro das aves, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta;
- Realizar a pesquisa de DNA de agentes Bartonellaceae (*Bartonella* spp.), Anaplasmataceae (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *N. helminthoeca*, *A. phagocytophilum* e *A. platys*) e Haemosporida (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.), nas amostras de sangue das aves e de seus ectoparasitas amostrados;
- Sequenciar as amostras positivas, realizando análise molecular filogenética dos agentes encontrados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo**

Aves carnívoras pertencentes às Ordens Accipitriformes (águias e gaviões), Falconiformes (falcões e carcarás); Strigiformes (corujas) e Cathartiformes (urubus) foram capturadas e amostradas nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. As 121 amostras de sangue obtidas foram provenientes de aves capturadas em seu habitat natural, assim como de aves atendidas no Ambulatório de Animais Selvagens do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel (AASHVGLN), da FCAV - UNESP – Jaboticabal, no Ambulatório Veterinário da Associação Mata Ciliar – Jundiaí – SP, bem como no Centro de Recuperação de Animais Silvestres (CRAS) - Vargem Pequena/RJ (**Quadro 1**) (Licença IBAMA nº 31743-1; Protocolo – Comissão de Ética nº4153/12).

### **4.2. Métodos de Captura**

Para a captura de falcões, corujas e gaviões selvagens, utilizou-se armadilha do tipo “bal-chatri” (CARVALHO FILHO et al., 2005), com camundongos isogênicos de

pelagem negra como isca, gentilmente cedidos pelo biotério da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto - SP. A armadilha era transportada juntamente com os pesquisadores em veículo comum e, assim que as aves eram avistadas com auxílio de binóculo, a aproximação era gradativa, sendo que a armadilha era colocada no chão, dentro do campo visual do animal. Assim que a ave era capturada na tentativa de predação do camundongo, os pesquisadores se aproximavam rapidamente, procurando restringir a visão do animal com auxílio de uma pequena toalha de tecido, para minimizar o estresse. Uma vez desvencilhada da armadilha, todos os procedimentos previstos de colheita eram realizados. As aves capturadas por este método foram amostradas nos municípios de Jaboticabal – SP e Descalvado – SP, em vários trechos rodoviários (**Quadro 1**). Para a captura de urubus de vida livre, utilizou-se a estrutura de uma antiga pocilga, a qual foi telada, deixando uma porta cujo movimento (de abertura ou fechamento) era controlado por uma corda, à distância. Com o objetivo de atrair as aves, dentro da pocilga foram colocados restos de vísceras de animais, obtidos em frigoríficos próximos. Estes animais foram amostrados em uma propriedade rural no município de Santa Ernestina – SP. Já para as aves provenientes do Ambulatório de Animais Silvestres do HVGLN, da FCAV – UNESP – Jaboticabal, ou aquelas em recuperação no ambulatório veterinário da Associação Mata Ciliar – Jundiaí – SP e no Centro de Recuperação de Animais Silvestres (CRAS) - Vargem Pequena/RJ, a captura e manipulação das mesmas foram facilitadas pela condição do recinto. Antes do procedimento de colheita de sangue, as aves foram acondicionadas em gaiolas, o que permitiu a rápida captura e contenção física, minimizando o estresse dos animais (**Figuras 1 a 4**).



**Figura 1.** Captura de exemplar macho da espécie *Falco sparverius* em Jaboticabal - SP.



**Figura 2.** Gavião Carijó (*Rupornis magnirostris*) jovem, capturado com auxílio da bal-chatri, em Descalvado – SP.

**Quadro 1.** Espécies e número de aves amostradas, incluindo local da captura e período de amostragem, assim como presença ou ausência de ectoparasitas, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil.

Espécie	Nome comum	Número de animais amostrados	Local de amostragem	Período de amostragem	Presença de Ectoparasitas
<i>Speotyto cunicularia</i>	Coruja Buraqueira	09	<sup>1</sup> FCAV; <sup>3</sup> AMC; <sup>5</sup> Descalvado - SP	03.2012 a 06.2014	Não
<i>Tyto alba</i>	Suindara	07	<sup>1</sup> FCAV; <sup>3</sup> AMC;	05.2012 a 04.2014	Não
<i>Polyborus plancus</i>	Carcará	06	<sup>1</sup> FCAV; <sup>4</sup> RJ	05.2012 a 05.2014	Não
<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	16	<sup>1</sup> FCAV; <sup>3</sup> AMC; <sup>4</sup> RJ; <sup>2</sup> Jaboticabal-SP; <sup>5</sup> Descalvado - SP	07.2012 a 07.2014	Sim (uma ninfa ingurgitada e três larvas de <i>Amblyomma</i> spp, em apenas uma ave)
<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	38	<sup>1</sup> FCAV; <sup>6</sup> Santa Ernestina – SP;	07.2012 a 10.2013	Não
<i>Asio clamator</i>	Coruja Orelhuda	09	<sup>1</sup> FCAV; <sup>3</sup> AMC; <sup>4</sup> RJ	08.2012 a 05.2014	Não
<i>Ictinia plumbea</i>	Gavião-pomba	01	<sup>1</sup> FCAV	09.2012	Não
<i>Megascops choliba</i>	Coruja-do-mato-pequena	14	<sup>1</sup> FCAV; <sup>3</sup> AMC; <sup>4</sup> RJ	10.2012 a 04.2014	Não
<i>Falco femoralis</i>	Falcão-coleira	04	<sup>1</sup> FCAV; <sup>5</sup> Descalvado - SP	02.2013 a 06.2014	Não
<i>Falco sparverius</i>	Falcão Quiri-quiri	10	<sup>4</sup> RJ; <sup>2</sup> Jaboticabal-SP; <sup>5</sup> Descalvado - SP	03.2013 a 06.2014	Não
<i>Milvago chimachima</i>	Gavião - carrapateiro	03	<sup>3</sup> AMC; <sup>5</sup> Descalvado - SP	12.2013 a 04.2014	Não
<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	02	<sup>4</sup> RJ	Abril de 2014	Não
<i>Asio stygius</i>	Mocho-diabo	01	<sup>4</sup> RJ	Abril de 2014	Não
<i>Falco peregrinus</i>	Falcão peregrino	01	<sup>4</sup> RJ	Abril de 2014	Não

**1.** FCAV. Ambulatório de Animais Selvagens do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel (AASHVGLN) , Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal – SP (21°14'95" S; 48°17'69" O); **2.** Jaboticabal-SP (21°13'83"S; 48°17'06"O); **3.** AMC. Associação Mata Ciliar – Jundiá – SP (23°10'11"S; 46°56'33"O); **4.** RJ. Centro de Recuperação de Animais Silvestres (CRAS) - Vargem Pequena/RJ (22°59'75"S; 43°27'75"O); **5.** Descalvado – SP (21°54'60"S; 47°37'14"O); **6.** Santa Ernestina – SP (21°27'94"S; 48°23'81"O).



**Figura 3.** Armadilha improvisada em antiga pocilga em propriedade rural no município de Santa Ernestina - SP, para captura de urubus (*Coragyps atratus*) – **A.** Vista lateral; **B.** Vista Interna.

### 4.3. Colheita das amostras

Após a captura, as aves foram contidas fisicamente e examinadas, observando-se o estado corpóreo, coloração de mucosas e aberturas naturais (bico, olhos, narinas, ouvidos, cloaca), além da verificação da presença de ectoparasitas.

A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção, utilizando-se agulhas e seringas esterilizadas. Utilizou-se preferencialmente a veia jugular direita, veia ulnar ou basílica e veia metatársica dorsal, de acordo com a espécie animal. Utilizaram-se seringas de 1 mL e agulhas 0,45 x 13mm, sendo que o volume obtido variou de acordo com a espécie animal, respeitando-se a colheita de volume correspondente a no máximo 1% do peso vivo da ave. Logo após a colheita, foram realizados esfregaços sanguíneos das aves. Metade do sangue foi depositada em microtubos de 1,5 mL contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% como anticoagulante (9 $\mu$ L para cada 100  $\mu$ L de sangue) e a outra parte em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. As amostras de sangue sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação (5000 rpm, durante 20 minutos) e uma vez obtidas, as amostras de sangue e soro foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas a -20°C até a realização dos testes. Para alguns animais amostrados, não foi possível a obtenção de soro devido à dificuldade na colheita e ao estado geral do animal. Desta forma, obtivemos 88 amostras de soro e /ou plasma das 121 aves amostradas.

No momento da contenção, procedeu-se também à procura minuciosa dos ectoparasitos por toda a superfície corporal do animal, sobretudo nas regiões menos acessíveis para as aves (como região dorsal do pescoço e face), quando realizam a limpeza corporal. Os ectoparasitas encontrados foram retirados da ave manualmente e acondicionados em frascos contendo álcool 70%.



**Figura 4.** Contenção de *Tyto alba* para colheita de sangue, na Associação Mata Ciliar – Jundiáí – SP.

#### **4.4. Pesquisa de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos**

Amostras de sangue dos animais capturados foram também utilizadas para confecção de três esfregaços sanguíneos por ave, os quais foram fixados pelo Metanol (Synth®) durante três minutos e corados pelo corante Giemsa (Sigma®) durante 40 minutos. A presença de corpúsculos de inclusão ou de mórulas sugestivos de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. nos leucócitos foram avaliados sob microscopia de luz (x1000), com a observação minuciosa de pelo menos 50 campos por lâmina. Também pesquisou-se a presença de hemosporídeos, tais como *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.

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

A Reação de Imunofluorescência Indireta foi realizada para detecção de anticorpos anti - *A. phagocytophilum*, anti-*Ehrlichia chaffeensis* e anti-*Ehrlichia canis*, em 88 amostras de soro ou plasma das aves capturadas. Procedeu-se à diluição das amostras a 1:40 em solução salina tamponada com fosfato, PBS pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 9,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Dez microlitros do soro diluído foram depositados em cada poço das lâminas contendo, em separado, substrato antigênico de *A. phagocytophilum* (amostra gentilmente cedida pelo Prof. Dr. John Stephen Dumler), *E. chaffeensis* (Scimedx Corporation, Denville, USA) e *E. canis* (Immunodot®, Jaboticabal, São Paulo, Brasil), 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 (tamponado com fosfato, 0,01 M, pH 7,2), secas e à cada poço foram adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de ave, marcado pelo isoticianato de fluoresceína), diluído conforme orientação do fabricante (1:10; Sigma®). As lâminas foram então novamente incubadas (30 minutos a 37°C), em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, cada lâmina foi montada com lamínula em glicerina tamponada em tampão carbonato - bicarbonato (pH 9,5). As lâminas foram visualizadas em microscópio equipado com luz fluorescente para avaliação. 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 (RISTIC et al., 1972).

Foram utilizadas amostras de soro de cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) como controles positivo e negativo para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, e soro de cães como controles para *E. canis*, ambos obtidos no Laboratório de Imunoparasitologia, do Depto de Patologia, da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

## **4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

### **4.6.1 Extração de DNA**

A extração de DNA de sangue total foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante, porém com algumas modificações (uso do tampão ATL e 10 µL de sangue total, extraído duas vezes para realização de “pool”). O DNA extraído foi armazenado a -20°C e submetido a dosagem de sua concentração em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific), antes da realização da PCR.

#### 4.6.2 PCR em Tempo Real (qPCR)

Realizou-se a PCR em Tempo Real (qPCR) Multiplex para *Ehrlichia* spp., (gene *groE*), *Anaplasma* spp. (gene *groE*) e *Bartonella* spp. (gene *nuoG*) (**Tabela 1**) (ANDRÉ, 2012), assim como qPCR para detectar especificamente *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*) (**Tabela 2**). As reações de amplificação foram realizadas utilizando uma reação de volume total final de 10µL, contendo uma mistura com 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix®, BioRad) e água estéril ultra-pura (Nuclease-Free Water®, Promega) q.s.p. 10µL. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler® (BioRad). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Água estéril ultra-pura (Promega®) foi utilizada como “branco” na reação. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos.

Diluições seriadas foram feitas para construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial (plasmídeos IDT psmart, (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) contendo a sequência-alvo ( $2,0 \times 10^7$  cópias/ µL a  $2,0 \times 10^0$  cópias/ µL). A partir daí, a Eficiência da Amplificação (E) foi calculada a partir da curva-padrão por meio da fórmula  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ .

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados na qPCR multiplex para os gêneros *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp. (ANDRÉ, 2012).

Agentes	Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sonda de hidrólise (Probe TaqMan)
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>groE</i>	5'-GCGAGCATAAATACTCAGAG-3' 5'-CAGTATGGAGCATGTAGTAG-3'	TET- 5'- CCACCTTATCATTACACTGAGACG- 3'[BHQ2a-Q]3'
<i>Anaplasma</i> spp.	<i>groE</i>	5'-TTATCGTTACATTGAGAAGC-3' 5'-GATATAAAGTTATTAAGTATAAAGC-3'	Cy-5- 5'- CATTGGCTCTTGCTATTGCTAAT- 3'[BHQ2a-Q]3'
<i>Bartonella</i> spp.	<i>nuoG</i>	5'-CAATCTTCTTTGCTTCACC-3' 5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3'	TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG- 3'[BHQ2a-Q]3'

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores, genes alvo e sondas de hidrólise (probe TaqMan) utilizados nas qPCRs para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum* (RELLER et al., 2010).

Agentes	Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sonda de hidrólise (Probe TaqMan)
<i>E. chaffeensis</i>	<i>vIpt</i>	F (5'-CTAATTCTGATTTACACGAGTCTTC-3') R (5'-CATCATCTTCGAATTGAACTT C-3')	5'[TAMRA] (TTGA GTGTCC[BHQ2a-Q]3'
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>msp-2</i>	F (5'-GAAGATGAW GCTGATACAGTA-3') R (5'- CAACHGCCTTAGCAAA CT-3')	5'[Cy-5](TTATCAGTC TGTCAGTAACA[BHQ2a-Q] 3'

### 4.6.3 PCR Convencional

#### 4.6.3.1 Reações de Amplificação

Nas reações de PCR convencional, utilizou-se como gene alvo o 16SrRNA para agentes Anaplasmataceae e o gene citocromo B para agentes Haemosporida (**Quadro 2**). Para detecção e caracterização molecular das amostras PCR positivas para o gene 16SrRNA de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., utilizaram-se também protocolos baseados nos genes alvo *omp-1*, *dsb* e *groESL* (**Quadro 3**). Foram utilizados 5 ul de

DNA de cada amostra, 1,25 Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril q.s.p. 25 µL. Nas reações de nested PCR, foram utilizados os mesmos reagentes e concentrações, porém 3µL do produto amplificado na primeira reação.

Para controle interno da extração de DNA e possível detecção de inibidores da PCR, realizou-se inicialmente a amplificação do fragmento de DNA relacionado à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F CCTTCATTGACCTCAACTACAT e GAPDH-R CCAAAGTTGTCATGGATGACC) (BIRKENHEUER et al., 2003) .

Os controles positivos de *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii* e *N. helminthoeca* foram gentilmente cedidos pelo Prof. John Stephen Dumler (University of Maryland, Maryland, USA). Já os controles positivos de *E. canis* e *A. platys* foram disponibilizados pela Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosangela Zacarias Machado, no Laboratório de Imunoparasitologia (Departamento de Parasitologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP). Os oligonucleotídeos iniciadores e as sequências térmicas utilizados nas PCRs convencionais para agentes Anaplasmataceae (gene 16SrRNA) e hemosporídeos (gene citocromo B) estão representados no **Quadro 2**. O critério de seleção dos genes alvo 16S e citocromo B baseou-se no fato de que os mesmos são genes conservados, e portanto permitiriam a detecção de várias espécies dos patógenos em questão, incluindo variantes genotípicas ainda não conhecidas.

**Quadro 2.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores para as reações de PCR e nested PCR, tamanho do amplímero (pb), seqüência térmica e referências utilizadas, relacionados a cada agente pesquisado (agentes Anaplasmataceae gene alvo 16SrRNA; hemosporídeos, gene alvo citocromo B).

Agente	Sequencia do oligonucleotídeo	pb	Sequencia térmica	Referência
<b><i>Ehrlichia</i> spp.</b>				
- ECC	5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'	478	-94 °C por 5 min.; -40 ciclos: 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min. a 72 °C; 72 °C por 5min	MURPHY et al., 1998
- ECB	5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'			
<b>Nested <i>E. canis</i></b>				
- ECAN-5	5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -3'	358	94 °C por 5 min 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C; 72 °C por 5 min	MURPHY et al., 1998
-HE3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'			
<b>Nested <i>E. chaffeensis</i></b>				
- CHAF	5'CAA TTG CTT ATA ACC TTT TGG TTA TAA AT 3'	410	94 °C por 5 min 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C; 72 °C por 5 min	PERSING, 1996;
- GAIUR	5'- GAC TTT GCC GGG ACT TCT TCT - 3'			
<b>Nested <i>E. ewingii</i></b>				
- 18F	5'- AGTTTGATCATGGCTCAG-3'	412	94 °C por 5 min 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 2 min a 45 °C e 2 min a 72 °C 72 °C por 5 min	PERSING, 1996
- 1448R	5'- CCATGGCGTGACGGCAGTGTG-3'			
- Ewingii	5'-CAATTCCTAAATAGTCTCTGACTATT-3'			
- GAIUR	5'-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3'			
<b><i>Anaplasma platys</i></b>				
- Platys F	5'- AAGTGCAACGGATTTTTGTC-3'	504	94 °C por 5 min 40 ciclos: 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 90 s a 72 °C; 72 °C por 5 min	INOKUMA et al., 2001
- Platys-R	5'- CTTTAACTTACCGAACCC-3			
<b><i>A. phagocytophilum</i></b>				
- gE3a	5'- CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	546	94 °C por 5 min 40 ciclos: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 1 min a 72 °C; 72 °C por 5 min	MASSUNG et al., 1998
- gE10R	5'- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'-3'			
- gE2	5'- GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'			
- gE9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'			
<b><i>Neorickettsia risticii</i></b>				
- ER3-F	5'- ATTTGAGAGTTTGATCCTGG-3'	529	94 °C por 5 min 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 2 min a 72 °C e 2 min a 72 °C; 72 °C por 5 min	CHAE et al., 2003
- ER2-R	5'- GTTTTAAATGCAGTTCTTGG-3'			
- ER3a-F	5'- CTAGCGGTAGGCTTAAC-3'			
- ER2a-R	5'- CACACCTAACTTACGGG-3'			
<b><i>N. helminthoeca</i></b>				
NeoSH – F	5'-TAGGCCCGCGTTAGATTAGCTTGT-3'	200	94 °C por 2 min 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 45 s a 67 °C e 45 s a 72 °C; 72 °C por 5 min	HEADLEY et al., 2006
NeoSH - R	5'-TACAACCCAAGGGCCTTCATCACT-3'			
<b><i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp.</b>				
HamNF-1	5' – CATATATTAAGAGAATATGGAG-3'	480	94 °C por 3 min 20 ciclos: 30 s. a 94 °C, 30 s a 50 °C e 45 s. a 72 °C; 72 °C por 10 min; 94 °C por 3 min 35 ciclos: 30 s. a 94 °C, 30 s. a 55 °C e 45 s. a 72 °C; 72 °C por 10 min;	HELLGREN et al., 2004
HaemNR3	5' – ATAGAAAGATAAGAAATACCATTCC-3'			
Haem F	5' – ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3'			
Haem R2	5' – GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'			
<b><i>Leucocytozoon</i> spp.</b>				
HaemFL	5' – ATGGTGTTTTAGATACTTACATT – 3'	478	94 °C por 3 min 35 ciclos: 30 s. a 94 °C, 30 s. a 50 °C e 45 s. a 72 °C; 72 °C por 10 min;	HELLGREN et al., 2004
HaemR2L	5' – CATTATCTGGATGAGATAATGG – 3'			

**Quadro 3.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do amplímero (pb), sequência térmica e referências, utilizados nas reações de PCR e nested PCR realizadas apenas para amostras previamente positivas na qPCR para o gene *groESL* e PCR convencional para o gene *16SrRNA* (*Ehrlichia* spp/ *Anaplasma* spp.).

Agente (gene alvo)	Sequência do oligonucleotídeo	pb	Sequência térmica	Referência
<b><i>Ehrlichia</i> spp.(omp-1)</b>				
- conP28-F1	5'-AT(C/T)AGT(G/C)AAA(A/G)TA(T/C)(A/G)T(G/A)CCAA-3'	300	94°C por 3 min.; 35 ciclos: 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 2 min. a 72°C; 72°C por 7min.	INAYOSHI et al., 2004
- conP28-R1	5'- TTA(G/A)AA(A/G)G(C/T)AAA(C/T)CT(T/G)CCTCC-3'			
- conP28-F2	5'CAATGG(A/G)(T/A)GG(T/C)CC(A/C)AGA(AG)TAG-3'			
- conP28-R2	5'-TTCC(T/C)TG(A/G)TA(A/G)G(A/C)AA(T/G)TTTAGG-3			
<b><i>Ehrlichia</i> spp.(dsb)</b>				
- dsb 330	5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3'	409	95°C por 2 min. 50 ciclos: 15 s a 95°C, 30 s a 58°C e 30 s a 72°C; 72°C por 5 min.	DOYLE et al., 2005
- dsb 728	5'- CTGCTGCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'			
<b><i>Ehrlichia</i> e <i>Anaplasma</i> spp. (<i>groESL</i>)</b>				
- HS1a	5'-AITGGGCTGGTAITGAAAT-3'	1297	3 ciclos iniciais: 94°C por 1 min., 48°C por 2 min., 72°C por 1 min. e 30 s; 37 ciclos: 94°C por 1 min., 48°C por 2 min., 72°C por 1 min. e 30 s; 72°C por 5 min; Na segunda reação (nested PCR), a temperatura de anelamento foi aumentada para 55°C.	SUMNER et al., 1997; NICHOLSON et al., 1999; LOTRIC-FURLAN et al., 1998; LIZ et al., 2000
- EHR-CS778R	5'- CCICIGGIACIAIACCTTC-3'			
- HS43	5'-AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC-3'			
- HSVR	5'-CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC-3'			

#### 4.6.3.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 55 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base. Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemidoc - BioRad®).

#### 4.6.3.4 Extração e Purificação das amostras

Após a reação de PCR, as bandas referentes a cada amplímero foram cortadas

do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 2,0 mL devidamente identificados. Na sequência, foi realizada extração do produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se um kit de purificação de DNA (Fermentas®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para as amostras em que se observou apenas uma banda no gel, procedeu-se a purificação do DNA diretamente do produto da nested PCR, utilizando-se o mesmo kit.

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

#### **4.6.4 Sequenciamento**

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems) e as amplificações se deram inicialmente no termociclador (MJ Research-Inc).

O sequenciamento foi conduzido no Centro De Recursos Biológicos e Biologia Genômica, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp – Campus de Jaboticabal - SP).

#### **4.6.5 Análise das sequências e construção das árvores filogenéticas**

A trimagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes à cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) foi utilizado para realizar o alinhamento da sequência consenso. O programa BLAST foi utilizado para analisar as

sequências de nucleotídeos (BLASTn), objetivando-se procurar e comparar sequências similares em banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002) com aquelas obtidas. As sequências salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (genbank), utilizando o software Clustal/W via Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Foi realizada análise de máxima verossimilhança utilizando o cluster blackbox RaxML (STAMATAKIS et al., 2008), via portal CIPRES (MILLER et al., 2010), estimando a proporção de sítios invariáveis pelo modelo evolutivo GTRGAMMA+I. A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER e MULLER, 2010).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Presença de Ectoparasitas

Apenas um gavião carijó (*R. magnirostris*) (0,8%), capturado com auxílio da bal-chatri no município de Descalvado-SP estava parasitado com carrapatos. Foram recolhidas uma ninfa de *Amblyomma* spp. próxima da abertura nasal esquerda da ave, assim como três larvas do mesmo gênero, nas patas do animal (**Figura 5**). Para a identificação específica dos carrapatos amostrados, ainda será realizada a PCR convencional (baseada no gene 18S) a partir do DNA extraído dos mesmos.



**Figura 5.** Gavião Carijó (*R. magnirostris*) recém capturado em Descalvado – SP, evidenciando a presença de uma ninfa ingurgitada de *Amblyomma* spp. na proximidade da abertura nasal esquerda.

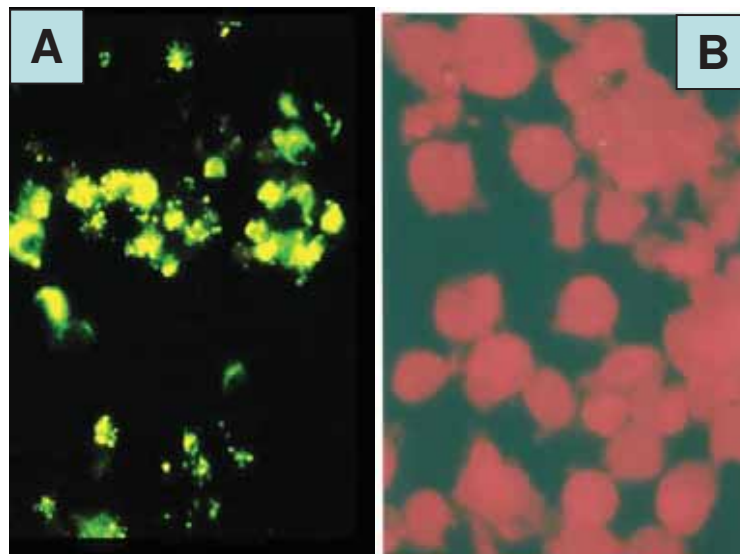
## 5.2. Avaliação dos esfregaços sanguíneos

Nas lâminas coradas pelo Giemsa e avaliadas em microscopia de luz (com aumento de 400 ou 1000X), não foram encontradas mórulas ou inclusões de *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. no interior dos leucócitos observados. De forma semelhante, outros parasitas, tais como *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. também não foram visualizados.

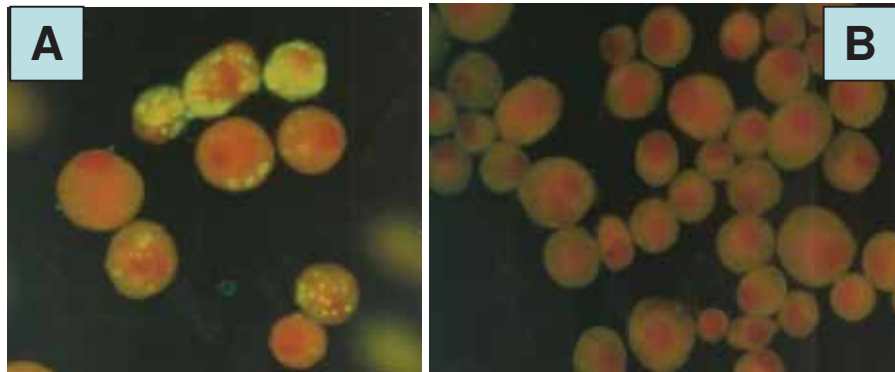
## 5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Cinco aves (5,68%) mostraram-se sororreagentes na diluição de 1:40 na RIFI para *A. phagocytophilum*, em um total de 88 amostras de soro ou plasma testadas, o que equivale a uma prevalência de 5,68%. As amostras positivas foram referentes a

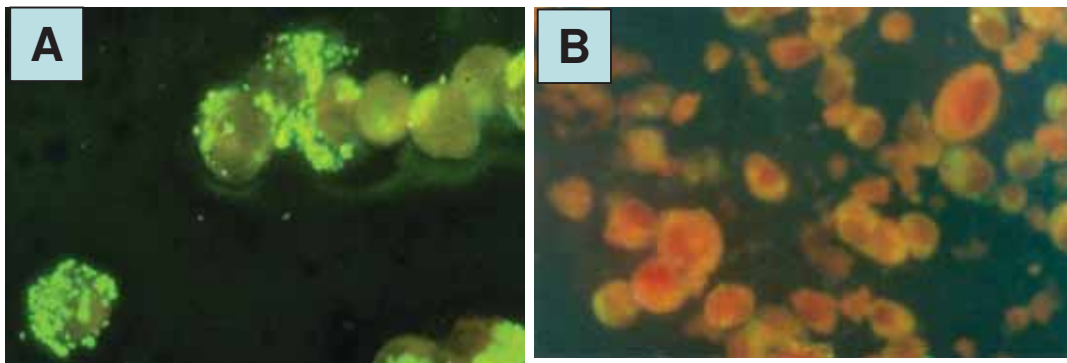
duas aves da espécie *Rupornis magnirostris* (gavião carijó), capturados utilizando-se a bal-chatri nas proximidades da FCAV – UNESP – Jaboticabal, e três da espécie *Coragyps atratus* (urubu), provenientes do município de Santa Ernestina - SP. Observou-se que as amostras reagiram fracamente, no que se refere a intensidade da fluorescência, quando comparadas com o controle positivo (**Figura 6**). Já na RIFI utilizando-se antígeno de *Ehrlichia chaffeensis*, três amostras (3,41%) mostraram-se reagentes na diluição de 1:40. As aves soropositivas foram um espécime de *Coragyps atratus* (urubu), proveniente do município de Santa Ernestina – SP, uma ave da espécie *Asio clamator* (coruja orelhuda), proveniente do AASHVGLN - FCAV – UNESP - Jaboticabal – SP e também um exemplar de *Megascops choliba* (coruja-do-mato-pequena), proveniente da AMC - Jundiaí, SP. Destas aves, a intensidade da fluorescência foi maior na RIFI realizada com o soro de *C. atratus*, enquanto as outras amostras reagiram fracamente em relação ao controle positivo (**Figura 7**). Em relação à RIFI para *E. canis*, todas as amostras testadas mostraram-se soronegativas (**Figura 8**).



**Figura 6.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de cervo-do-Pantanal) para *A. phagocytophilum*. Em A, são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B, não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 400X e 1000X, respectivamente.



**Figura 7.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de cervo-do-Pantanal) para *Ehrlichia chaffeensis*. Em A são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 1000X.



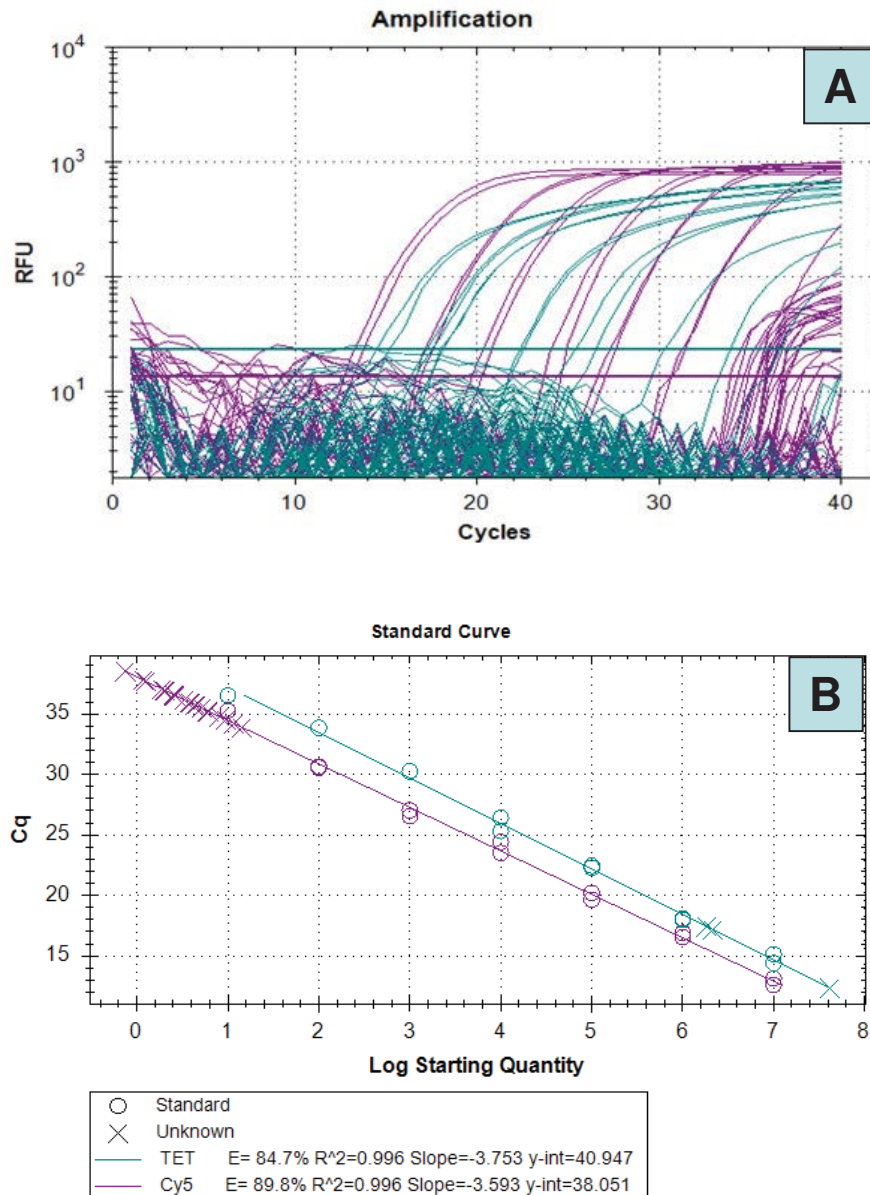
**Figura 8.** Reação de Imunofluorescência Indireta, mostrando soropositividade (A) e soronegatividade (B) dos controles positivo e negativo (soro de felino) para *Ehrlichia canis*. Em A são observadas mórulas fluorescentes no interior das células, ao passo que em B não se verifica a presença das mesmas. Aumento de 1000X.

#### 5.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Os resultados da qPCR Multiplex para *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp. revelaram a positividade de 12 aves para *Anaplasma* spp. (9,91%), com eficiência da reação de E=84,7% para *Ehrlichia* e E=89,8% para *Anaplasma*. (Tabela 3; Figura 9).

Na qPCR para *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* e *Bartonella* spp, todas as

amostras testadas mostraram-se negativas (**Figuras 10, 11 e 12**), com eficiência da reação de 100,2%, 95,5% e 97,5%, respectivamente.

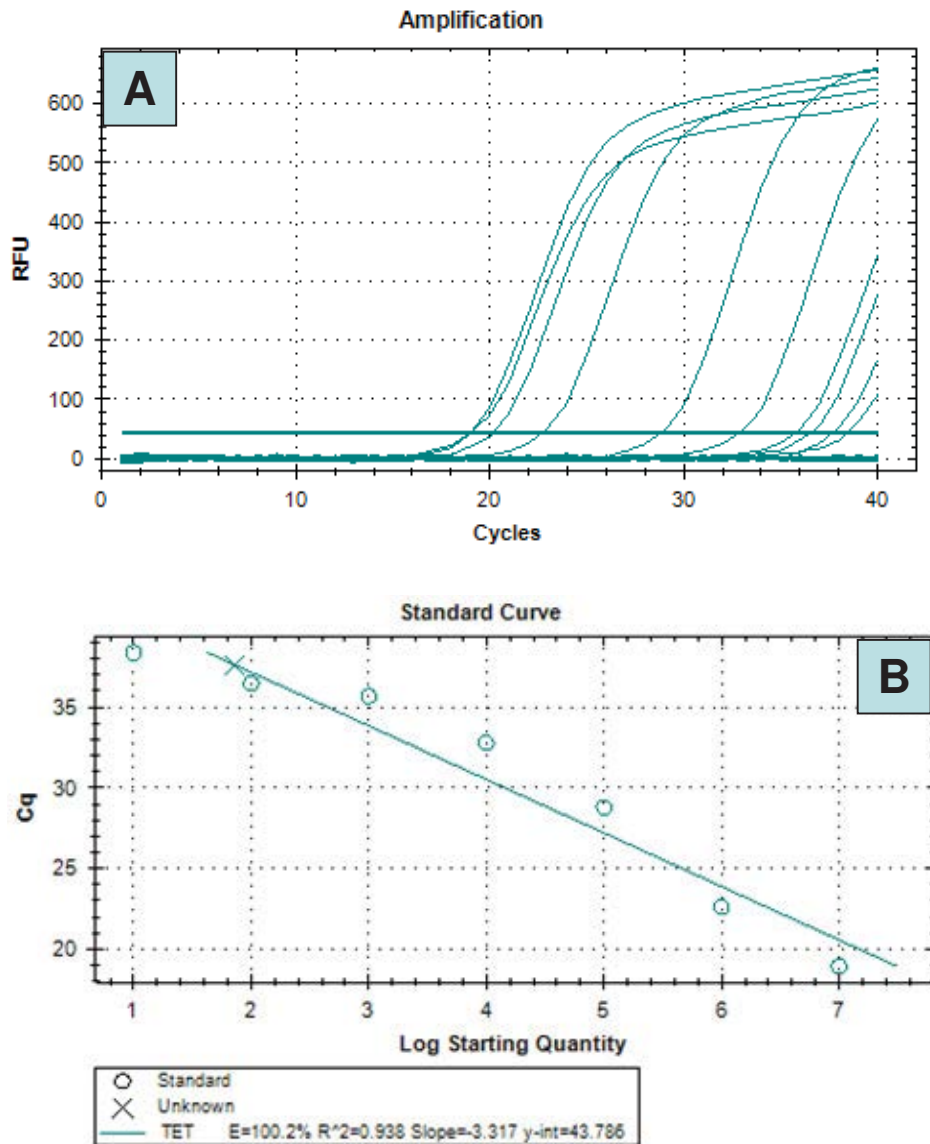


**Figura 9.** Resultados da qPCR para *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp. (gene alvo *groE*; linhas azul e violeta, respectivamente). Em A, são evidenciadas amostras positivas para *Anaplasma* spp. do lado direito e inferior do quadro. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.

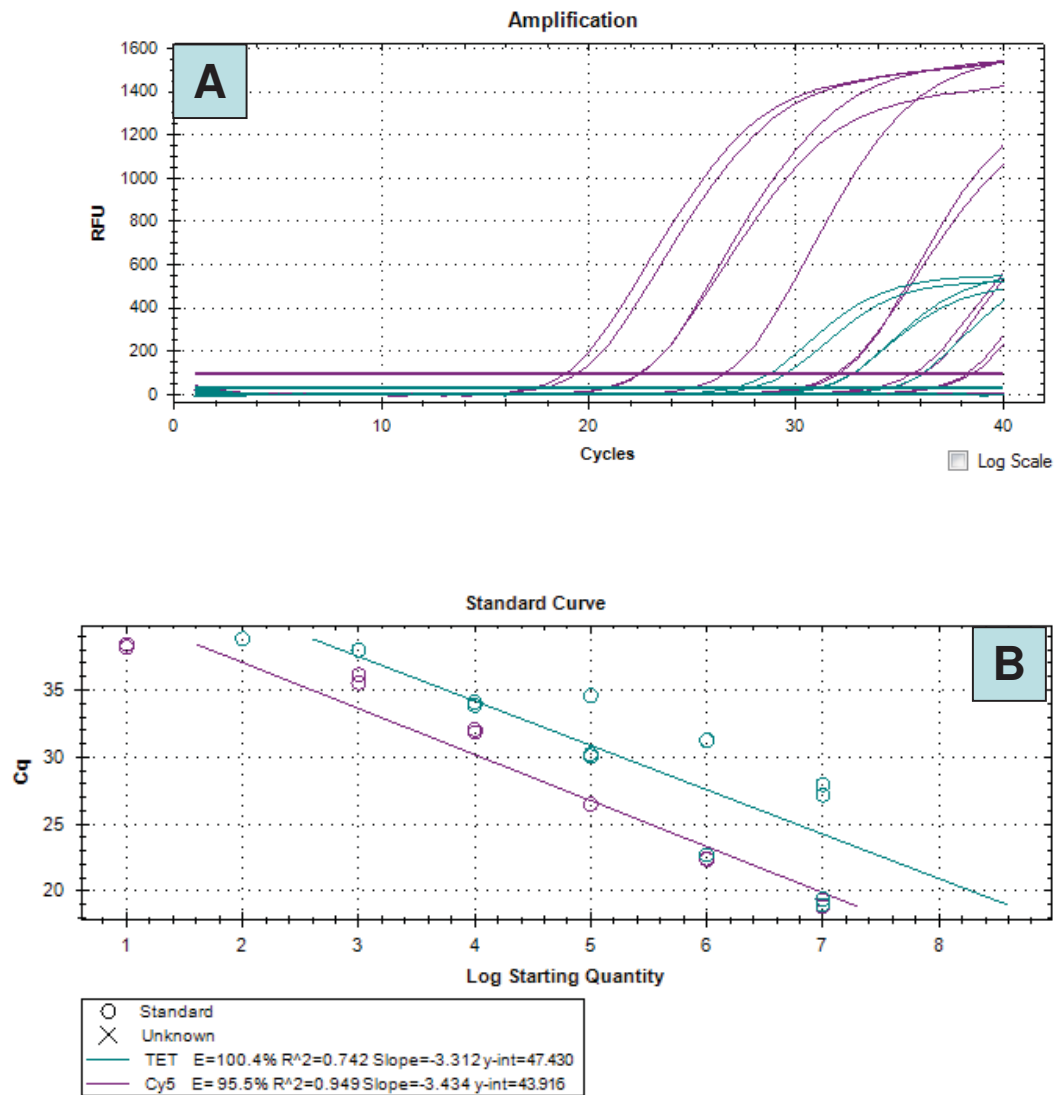
**Tabela 3.** Espécies e origem das aves positivas na qPCR para *Anaplasma* spp. (gene *groE*).

Nºda amostra	Nome comum	Nome científico	Local de amostragem
75	Coruja-do-mato	<i>Megascops choliba</i>	<sup>1</sup> AMC;
78	Coruja Buraqueira	<i>Speotyto cunicularia</i>	<sup>1</sup> AMC;
83	Suindara	<i>Tyto alba</i>	<sup>1</sup> AMC;
87	Mocho Orelhudo	<i>Asio clamator</i>	<sup>1</sup> AMC;
113	Coruja Buraqueira	<i>Speotyto cunicularia</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP
115	Gavião carrapateiro	<i>Milvago chimachima</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP
116	Falcão- de-coleira	<i>Falco femoralis</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP
117	Falcão- de-coleira	<i>Falco femoralis</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP
118	Gavião Carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	<sup>3</sup> Jaboticabal - SP;
119	Gavião Carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP
120	Gavião Carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	<sup>3</sup> Jaboticabal - SP;
121	Gavião Carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	<sup>2</sup> Descalvado - SP

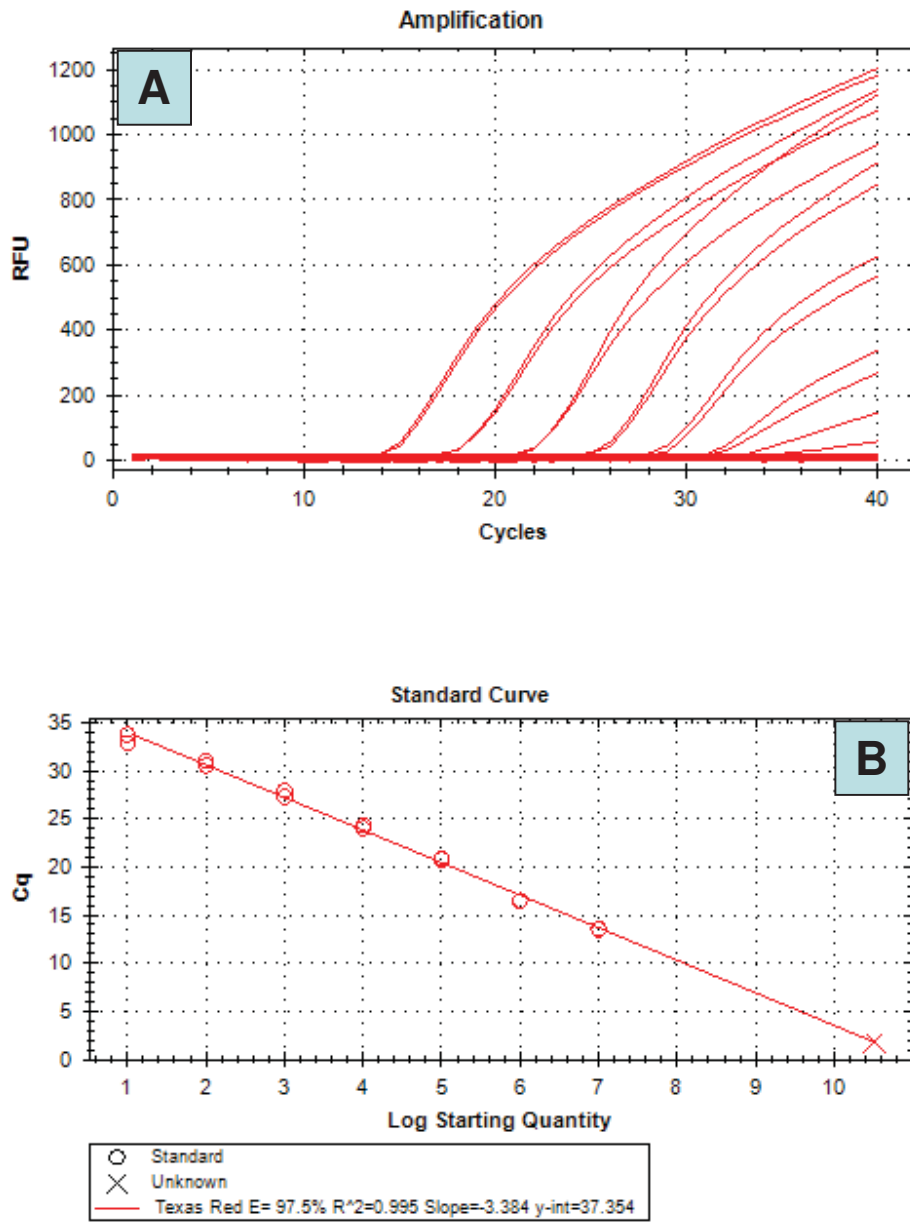
- 1.** AMC. Associação Mata Ciliar – Jundiá – SP (23°10'11"S; 46°56'33"O);  
**2.** Descalvado – SP (21°54'60"S; 47°37'14"O); **3.** Jaboticabal-SP (21°13'83"S; 48°17'06"O).



**Figura 10.** Resultados da qPCR realizada para *Ehrlichia chaffeensis* (gene alvo *vlpf*) (linha azul). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.



**Figura 11.** Resultados da qPCR realizada para *A. phagocytophilum* (gene alvo *msp-2*) (linha violeta). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.

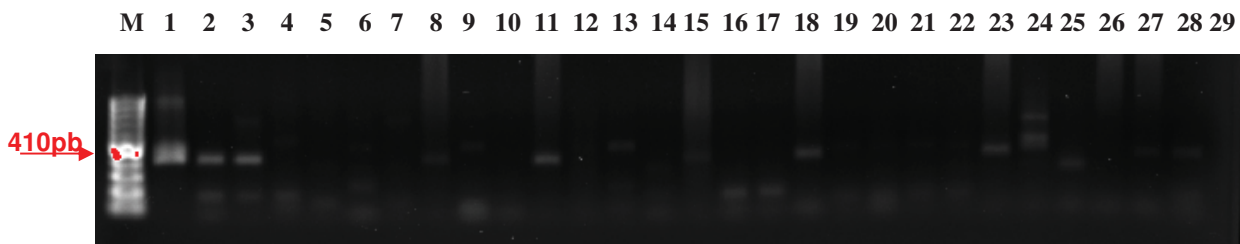


**Figura 12.** Resultados da qPCR realizada para *Bartonella* spp. (gene alvo *nuoG*) (linha vermelha). Em A, apenas os padrões são evidenciados no quadro, enquanto todas as amostras testadas mostraram-se negativas. Em B, a curva-padrão evidencia a eficiência da reação.

### 5.5. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

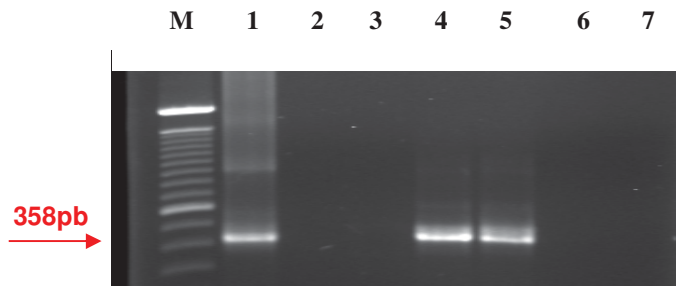
Todas as amostras testadas mostraram amplificação do fragmento referente ao gene alvo GAPDH, atestando que as mesmas estavam livres de inibidores na cPCR.

Na PCR convencional realizada para o gene 16SrRNA para *E. chaffeensis*, cinco aves (4,13%) mostraram-se PCR positivas, com confirmação pelo sequenciamento do produto da nested PCR. As aves PCR positivas foram representadas por dois exemplares de *Speotyto cunicularia* (coruja buraqueira), provenientes do Ambulatório de Animais Selvagens da FCAV – UNESP – Jaboticabal (AASHVGLN) e da Associação Mata Ciliar – Jundiaí – SP (AMC), um espécime de *Megascops choliba* (Coruja-do-mato-pequena), também proveniente do AASHVGLN da FCAV – UNESP – Jaboticabal, uma ave da espécie *Rupornis magnirostris* (gavião carijó) e um espécime de *Tyto alba* (Suindara), ambos proveniente da AMC – Jundiaí – SP (**Quadro 4, Figura 13**).



**Figura 13.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 410 pb, na PCR para *E. chaffeensis* (gene 16SrRNA). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1: controle positivo (410 pb); Canaleta 29: branco; Canaletas 2, 3, 11, 18 e 23: amostras PCR positivas.

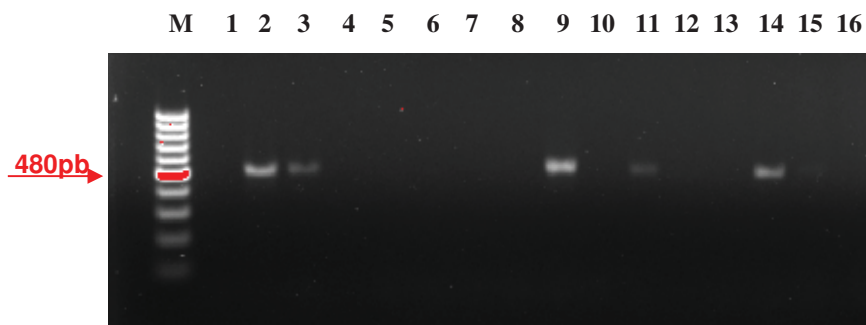
Já na PCR convencional realizada para *E. canis* (gene 16SrRNA), três aves mostraram-se positivas (2,47%): dois indivíduos da espécie *Rupornis magnirostris* (gavião carijó), provenientes do AASHVGLN da FCAV – UNESP- Jaboticabal e do município de Descalvado – SP, e um espécime de *Asio clamator* (Coruja Orelhuda), proveniente do Ambulatório Veterinário da AMC - Jundiaí, SP (**Figura 14**).



**Figura 14.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 358 pb, na PCR para *E. canis* (gene 16SrRNA). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 1: controle positivo (358 pb); Canaleta 7: branco; Canaletas 4 e 5: amostras PCR positivas.

Amostras PCR positivas para o gene alvo 16SrRNA de *E. chaffeensis* e *E. canis*, foram também submetidas à PCRs convencionais para os genes *omp-1*, *dsb* e *groESL*, porém todas as amostras mostraram-se negativas.

Algumas aves também mostraram-se PCR positivas para hemosporídeos: três indivíduos da espécie *Megascops choliba* (coruja-do-mato-pequena), provenientes da AMC – Jundiaí – SP e PCR positivas para *Haemoproteus* spp. (2,48%), e um exemplar de *Ictinia plumbea* (gavião-pomba), proveniente do AASHVGLN da FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP, e PCR positiva para *Plasmodium* spp. (0,83%). Uma vez que a PCR convencional não permite a diferenciação dos agentes, a identificação do gênero do parasita foi realizada por meio do sequenciamento dos amplicómeros (**Quadro 5**).



**Figura 15.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (gene citocromo B). Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 2: controle positivo; Canaleta 16: branco; Canaletas 2, 3, 9 e 14: amostras PCR positivas.

No que se refere à PCR convencional baseada no gene *16SrRNA* para *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. ewingii*, *Neorickettsia risticii* e *N. helminthoeca* todas as amostras mostraram-se negativas. Em relação aos carrapatos, nenhuma amostra mostrou-se positiva, apesar da ave da qual os mesmos foram colhidos (Ave 119) apresentar-se positiva na qPCR para *Anaplasma* spp. (*groESL*) (**Quadro 4**).

Foi observada a co-positividade de *Ehrlichia* spp. (detectada na cPCR) e *Anaplasma* spp. (detectado na qPCR) nas amostras de número 78 (Coruja buraqueira), 83 (Suindara), 87 (Coruja Orelhuda) e 121 (Gavião-carijó). Em relação à amostra de número 89, foi observada co-positividade para *Ehrlichia* spp. na RIFI e *Haemoproteus* spp. na cPCR, porém não foi observada co-positividade entre agentes Anaplasmataceae na RIFI e na PCR (qPCR e cPCR) (**Quadro 4**).

**Quadro 4.** Resumo dos resultados positivos, indicando a espécie da ave, local de colheita da amostra e a positividade/negatividade para os vários testes realizados.

Nº da Amostra	Espécie (nome comum)	Local de colheita	PCR <i>E. chaffeensis</i>	PCR <i>E. canis</i>	RT – PCR <i>Anaplasma (groESL)</i>	RIFI <i>E. chaffeensis</i>	RIFI <i>A. phagocytophilum</i>	PCR <i>Plasmodium/ Haemoproteus</i>
10	Gavião pomba	1. FCAV	-	-	-	-	-	+
21	Gavião Carijó	2. Jaboticabal	-	-	-	-	+	-
24	Coruja orelhuda	1. FCAV	-	-	-	+	-	-
32	Urubu	5. Santa Ernestina	-	-	-	-	+	-
35	Urubu	5. Santa Ernestina	-	-	-	+	-	-
54	Urubu	5. Santa Ernestina	-	-	-	-	+	-
59	Urubu	5. Santa Ernestina	-	-	-	-	+	-
62	Coruja Buraqueira	1. FCAV	+	-	-	-	-	-
63	Coruja-do-mato	1. FCAV	+	-	-	-	-	-
68	Gavião Carijó	1. FCAV	-	+	-	-	-	-
69	Gavião Carijó	4. Descalvado	-	-	-	-	+	-
71	Gavião Carijó	3. AMC	+	-	-	-	-	-
75	Coruja-do-mato	3. AMC	-	-	+	-	-	-
78	Coruja Buraqueira	3. AMC	+	-	+	-	-	-
83	Suindara	3. AMC	+	-	+	-	-	-
87	Coruja orelhuda	3. AMC	-	+	+	-	-	-
89	Coruja-do-mato	3. AMC	-	-	-	+	-	+
90	Coruja-do-mato	3. AMC	-	-	-	-	-	+
92	Coruja-do-mato	3. AMC	-	-	-	-	-	+
113	Coruja Buraqueira	4. Descalvado	-	-	+	-	-	-
115	Gavião carrapateiro	4. Descalvado	-	-	+	-	-	-
116	Falcão Coleira	4. Descalvado	-	-	+	-	-	-
117	Falcão Coleira	4. Descalvado	-	-	+	-	-	-
118	Gavião Carijó	2. Jaboticabal	-	-	+	-	-	-
119	Gavião Carijó	4. Descalvado	-	-	+	-	-	-
120	Gavião Carijó	2. Jaboticabal	-	-	+	-	-	-
121	Gavião Carijó	4. Descalvado	-	+	+	-	-	-

**1.** FCAV. Ambulatório de Animais Selvagens do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel (AASHVGLN) , Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal – SP (21°14'95" S; 48°17'69" O); **2.** Jaboticabal-SP (21°13'83"S; 48°17'06"O); **3.** AMC. Associação Mata Ciliar – Jundiá – SP (23°10'11"S; 46°56'33"O); **4.** Descalvado – SP (21°54'60"S; 47°37'14"O); **5.** Santa Ernestina – SP (21°27'94"S; 48°23'81"O).

## 5.6. Análise das sequências

Produtos da PCR para *E. chaffeensis* purificados e enviados para sequenciamento foram analisadas no Blast e as sequencias obtidas apresentaram até 100% de identidade com *E. chaffeensis* str. West Paces, USA (número de acesso no GenBank CP007480.1). Da mesma forma, as sequências obtidas das amostras positivas purificadas da cPCR para *Haemoproteus* spp e *Plasmodium* spp (gene citocromo B), revelaram até 98% de identidade com *Haemoproteus* spp. detectados em pinguins de Magalhães em reabilitação no Brasil (número de acesso no GenBank KJ575554.1) e 97% com *Plasmodium* spp. detectado em cegonhas na América (número de acesso no GenBank JX546139.1) Além disso, verificou-se também que os produtos da cPCR para *E. canis* (gene 16SrRNA) apresentaram até 99% de identidade com *E. canis* detectada em carrapatos no Brasil (número de acesso no GenBank KF972450.1) (**Quadro 5**).

**Quadro 5.** Identidade pelo Blast dos amplicómeros sequenciados.

Nº da amostra	Agente identificado	Gene alvo	Tamanho do Fragmento	Identidade pelo Blast		
				Descrição	Máx. % identidade	Nº de acesso
10	<i>Plasmodium</i> spp.	<i>Citocromo B</i>	480 pb	<i>Plasmodium</i> sp CMV-2012 hap. H5	97%	JX546139.1
62	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	410 pb	<i>E. chaffeensis</i> str West Paces	98%	CP007480.1
63	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	410 pb	<i>E. chaffeensis</i> str West Paces	99%	CP007480.1
68	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	358 pb	<i>E. canis</i> clone Bctick-5	99%	KF972450.1
71	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	410 pb	<i>E. chaffeensis</i> str West Paces	99%	CP007480.1
78	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	410 pb	<i>E. chaffeensis</i> str West Paces	100%	CP007480.1
83	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	410 pb	<i>E. chaffeensis</i> str West Paces	99%	CP007480.1
87	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	358 pb	<i>E. canis</i> clone Bctick-5	99%	KF972450.1
89	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Citocromo B</i>	480 pb	<i>Haemoproteus</i> sp. Haplotype 41	97%	AF465589.1
90	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Citocromo B</i>	480 pb	<i>Haemoproteus</i> sp. SPMAG-5868	98%	KJ575554.1
92	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Citocromo B</i>	480 pb	<i>Haemoproteus</i> sp. Haplotype 41	96%	AF465589.1
121	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>16SrRNA</i>	358 pb	<i>Ehrlichia ewingii</i> isolate Aa2FT269	81%	KJ942205

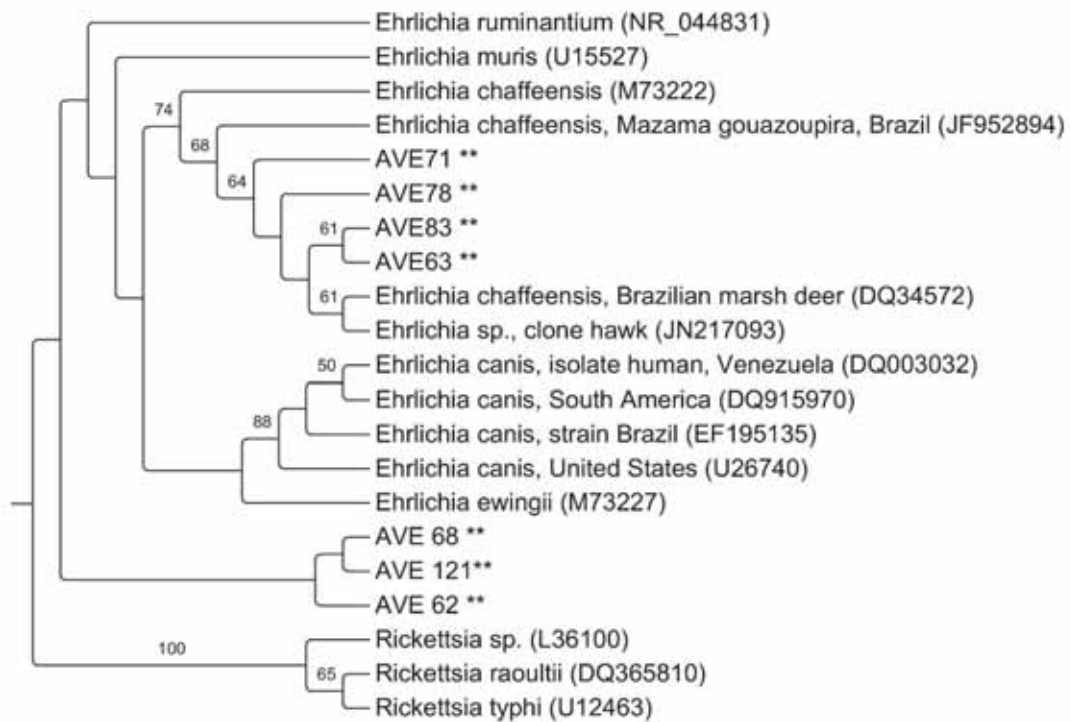
## 5.7. Árvores Filogenéticas

A análise filogenética realizada para as sequências do gene *16SrRNA* de *Ehrlichia* spp. encontradas nas aves carnívoras do presente estudo posicionou quatro das sequências no mesmo ramo das sequências de *Ehrlichia chaffeensis* encontradas em um cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus* - DQ345720) e em um veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* - JF952894) no Brasil, de uma sequência de *Ehrlichia chaffeensis* obtida através de um isolado humano (M73222) dos Estados Unidos e também de uma sequência de *Ehrlichia* spp. (JN217093) encontrada em uma ave carnívora do Brasil. Porém, três sequências obtidas das amostras de sangue das aves 62, 68 e 121, posicionaram-se em um ramo totalmente distinto das outras sequências de *Ehrlichia* depositadas no genbank, com base na análise filogenética de máxima verossimilhança (**Figura 16**) estimando a proporção de sítios invariáveis pelo modelo GTRGAMMA+I.

Em relação à análise filogenética do DNA de *Haemoproteus* spp., baseada no gene mitocondrial citocromo b, as sequências de *Haemoproteus* spp. encontradas nas aves sob estudo, posicionaram-se no mesmo grande ramo que as sequências de *Haemoproteus pallidus* (DQ630004.1), *Haemoproteus parabelopolskyi* (KM361478.1), *Haemoproteus belopolskyi* (DQ630006.1), *Haemoproteus lanii* (DQ630012.1), *Haemoproteus micronuclearis* (HQ386236.1), *Haemoproteus homobelopolskyi* (HQ386241.1), *Haemoproteus nucleofascialis* (HQ386243.1), *Haemoproteus majoris* (AF254977.1), *Haemoproteus paranucleophilus* (HQ386242.1) e *Haemoproteus balmorali* (DQ630014.1) previamente depositadas no Genbank, porém formaram um ramo distinto dentro deste grande ramo com base na análise filogenética de máxima verossimilhança (**Figura 17**), estimando a proporção de sítios invariáveis pelo modelo GTRGAMMA+I.

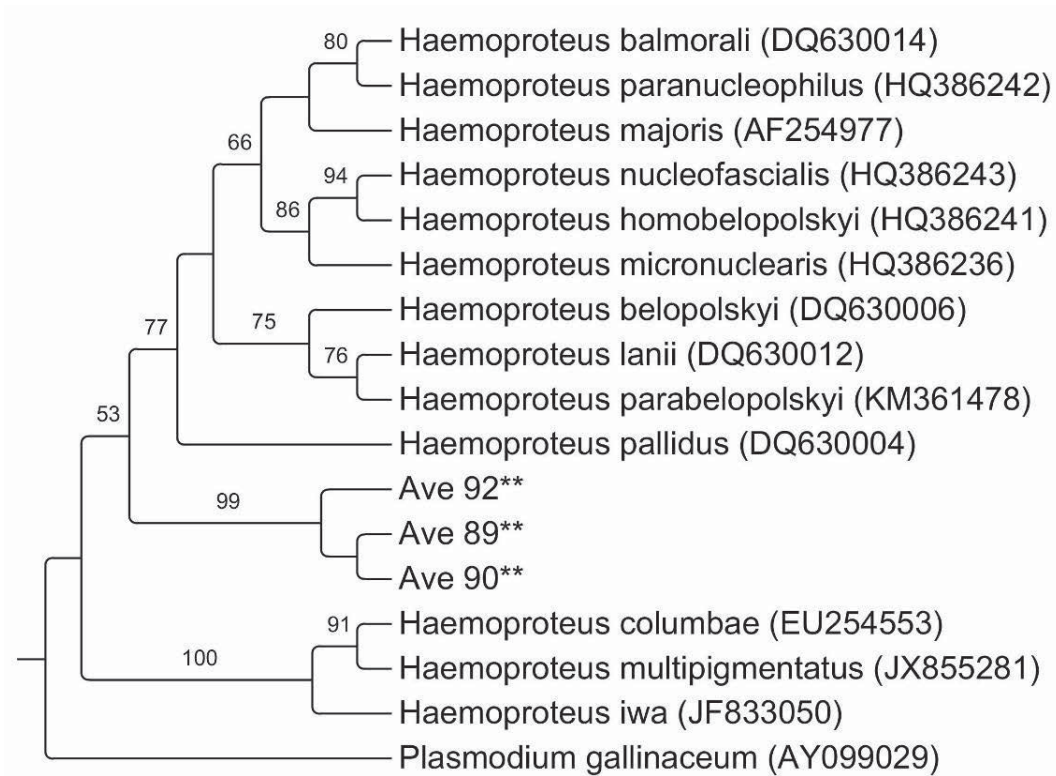
A sequência do fragmento do gene mitocondrial citocromo b de *Plasmodium* spp. obtido a partir da amplificação do DNA extraído de amostras de sangue dos animais sob estudo foram posicionados no mesmo ramo das sequências parciais do gene mitocondrial citocromo b de *Plasmodium elongatum* (JX029877), *Plasmodium*

*ashfordi* (AF254962) e *Plasmodium nucleophilum* (KM365040) depositadas no Genbank, com base na análise filogenética de máxima verossimilhança (**Figura 18**), estimando a proporção de sítios invariáveis pelo modelo GTRGAMMA+I.



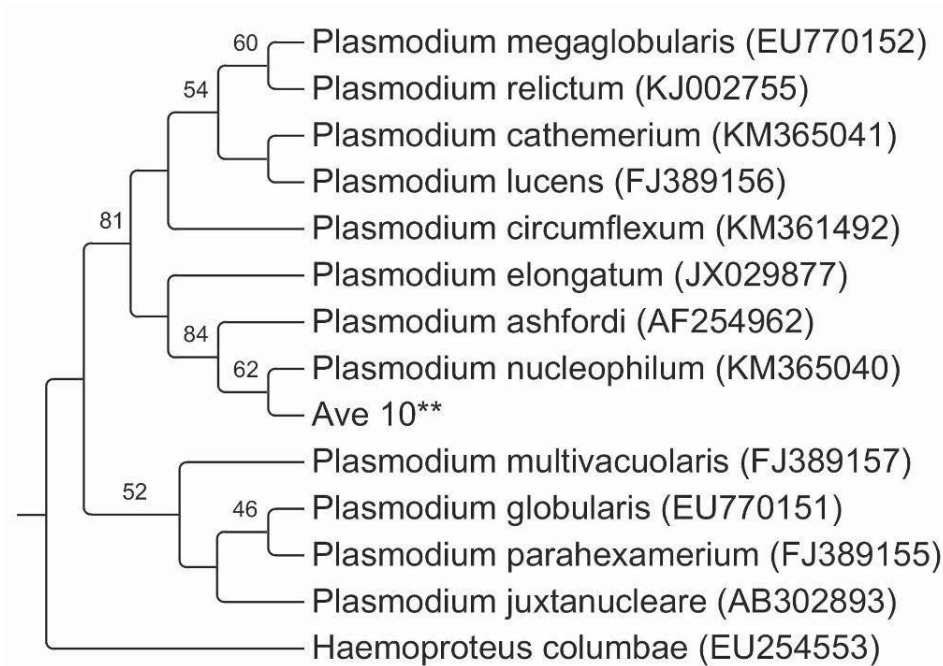
**Figura 16.** Posição filogenética de seqüências de *Ehrlichia* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em seqüências de DNA do gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das seqüências.

\*\* Sequências do presente estudo.



**Figura 17.** Posição filogenética de sequências de *Haemoproteus* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.

\*\* Sequências do presente estudo.



**Figura 18.** Posição filogenética de sequências de *Plasmodium* spp. detectadas em aves carnívoras do Brasil, com base em sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e modelo GTRGAMMA+I. Os números na árvore indicam valores de bootstrap acima de 45 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.

\*\* Sequências do presente estudo.

## 6. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi demonstrado, por meio da PCR e da RIFI, que algumas espécies de aves carnívoras estão expostas aos agentes da Família Anaplasmataceae (Rickettsiales: Anaplasmataceae) e da Ordem Haemosporida. Na RIFI, 5,68% (4 de 88) e 3,41% (3 de 88) das aves apresentaram anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e anti-*Ehrlichia chaffeensis*, respectivamente. Já na qPCR, 9,91% (12 de 121) das aves mostraram-se positivas para *Anaplasma* spp. (gene alvo groE), enquanto na cPCR 6,61% mostraram-se positivas para *Ehrlichia* spp. (gene 16SrRNA), 2,48% (3 de 121) para *Haemoproteus* spp. e 0,83% (1 de 121) para *Plasmodium* spp.

No que se refere aos agentes Anaplasmataceae, os resultados obtidos na RIFI para *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis* revelaram menor número de indivíduos positivos em relação à qPCR e à cPCR para os mesmos agentes. Nesse contexto, devemos considerar a variabilidade genética dos patógenos bem como a diversidade antigênica dos mesmos (principalmente *Anaplasma* spp.), pois apesar da evolução dos métodos diagnósticos, estes fatores interferem no diagnóstico específico. De forma semelhante, Sacchi et al (2012), em pesquisa de agentes Anaplasmataceae em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), obtiveram uma prevalência de 20,2% dos animais soropositivos ao antígeno de *A. phagocytophilum*, ao passo que cerca de 50% das amostras foram PCR positivas para *Anaplasma* spp. filogeneticamente próximo a *A. platys*. Assim, pelos resultados obtidos nesta pesquisa, sugere-se que os testes realizados identificaram exposição à agentes filogeneticamente próximos a *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*, porém localizados em clades distintas nas árvores filogenéticas.

Deve-se considerar que a sorologia pode não representar um bom método de diagnóstico para evidenciar o contato ou exposição das aves aos agentes infecciosos estudados. No Brasil, infecção experimental de carcarás (*Polyborus plancus*) com *Toxoplasma gondii* demonstrou que as aves apresentavam soroconversão por volta do 10º dia pós-infecção (DPI) e mostravam um pico na produção de IgG do 15º ao 30º DPI, havendo tendência à queda ou ausência de anticorpos posteriormente. Em razão da ausência de sinais clínicos nas aves, baixo nível de anticorpos e títulos, bem como da distribuição esparsa do parasita nos tecidos-alvo, os autores sugerem que o carcará é resistente à infecção por *T. gondii*. (VITALIANO et al., 2010). Assim, de forma semelhante, existe a possibilidade de que as aves não mantenham título de anticorpos após a exposição por agentes Anaplasmataceae devido a fatores diversos. Ainda Johnston et al. (2013), em um estudo de infecção experimental, relataram que *Turdus migratorius* e *Dumetella carolinensis* podem se infectar com e, em seguida, transmitir – embora de maneira não muito eficiente – *A. phagocytophilum* aos carrapatos, pois observaram que um exemplar de *Turdus* infectou 2 de 13 larvas de carrapatos em repasto sanguíneo no dia 07 pós-infecção. As aves, porém, não desenvolvem

bacteremia, anticorpos específicos ou doença grave por causa da exposição, mas os camundongos controle se tornam bacterêmicos, infectam carrapatos em repasto e também apresentam soroconversão. Estes resultados sugerem que estas duas espécies de aves não desempenham papel significativo como reservatórios do agente da anaplasmoze granulocítica humana e que inquéritos sorológicos nas aves podem não representar um indicador confiável da exposição à *A. phagocytophilum*.

No presente trabalho, como a amostragem dos animais foi realizada apenas para colheita de sangue e ectoparasitas, não foram analisadas as vísceras das aves, sobretudo baço e fígado, para pesquisa histopatológica e molecular dos agentes referidos. Não é possível afirmar, por exemplo, que havia infecção crônica por agentes Anaplasmataceae nas aves amostradas. É sabido que agentes Anaplasmataceae, sobretudo *Ehrlichia* spp., é encontrada preferencialmente em linfonodos, baço e fígado dos animais acometidos, cujo sistema imune reage contra a infecção. Em cães, foi verificado anteriormente que a punção do baço e posterior exame citológico, aumentam significativamente as chances de identificação de mórulas de *Ehrlichia canis* nos animais, em comparação com a detecção do agente em esfregaços de papa leucocitária (FARIA et al., 2010).

As espécies de aves estudadas nesta pesquisa não possuem hábitos migratórios, e geralmente abrangem pequenos territórios, podendo transportar patógenos e possivelmente transferi-los dentro de seu habitat. Apesar da baixa prevalência de ectoparasitas obtidos das aves nesta pesquisa (apenas um gavião-carijó parasitado), as diferentes estratégias de caça ou de alimentação das aves carnívoras também tem influência na exposição aos ectoparasitas e, conseqüentemente, aos patógenos. Por exemplo, animais que comumente permanecem mais no solo para a caça, como os carcarás (*Polyborus plancus*) poderiam estar mais susceptíveis à infestação por carrapatos, assim como é visto em seriemas (TEIXEIRA et al., 2008). O mesmo poderia ser considerado para os urubus, os quais permanecem no solo por um significativo período de tempo, em razão de se alimentarem de carcaças de animais. No entanto, nas regiões do Estado de São Paulo em que a maioria das aves foi amostrada, a paisagem dominante é representada pela monocultura da cana-de-açúcar. Nas

propriedades rurais locais, a criação animal foi drasticamente reduzida, diminuindo também o número de hospedeiros domésticos e selvagens, bem como as chances de sobrevivência dos carrapatos. Nessas áreas, permanece basicamente o ciclo de parasitismo selvagem potencialmente reduzido. Além disso, na cultura de cana-de-açúcar, o uso constante de produtos no controle de pragas, como Fipronil (CHAUZAT et al., 2011), pode auxiliar na redução das populações de carrapatos presentes no meio, o que pode justificar a baixa ocorrência de carrapatos nas aves estudadas. Não houve a identificação específica dos espécimes de *Amblyomma* spp. amostrados, porém sabe-se que os estádios de larva e ninfa de *Amblyomma longirostre* têm como hospedeiros preferenciais as aves (BOTÃO-MIRANDA et al., 2001; STORNI et al., 2005; VENZAL et al., 2005 citados por TEIXEIRA et al., 2008). Além disso, larvas e ninfas de *A. cajennense* tem menor especificidade de hospedeiro e também são encontradas em aves carnívoras (TEIXEIRA et al., 2008).

Corujas e gaviões alimentam-se de insetos, pequenos mamíferos e até algumas espécies de aves. É válido ressaltar que os pequenos roedores silvestres são incriminados em diversas partes do mundo, como reservatórios de vários agentes, incluindo o *A. phagocytophilum* (CAO et al., 2006; WEN et al., 2003; KIM et al., 2006). Nesta situação, o contato direto com a presa ou ectoparasitas presentes na mesma poderia representar uma fonte de infecção. Além disso, ocorre a ingestão da presa infectada e suas vísceras, mas não há dados suficientes que indiquem a ocorrência de infecção oral com agentes Anaplasmataceae, pois o baixo pH estomacal das aves de rapina e corujas contradizem esta teoria, como é tido para *Borrelia* spp. (HEIDENREICH 1995). Até o momento, no Brasil, não há pesquisas envolvendo pequenos roedores e a presença de agentes da família Anaplasmataceae. Além disso, os vetores envolvidos nestes ciclos permanecem desconhecidos. É válido lembrar que existe a possibilidade da infecção das aves ocorrer ainda no ninho. O transporte da presa inteira para os filhotes no ninho pode representar uma fonte de infecção, uma vez que o animal abatido pode carrear carrapatos infectados e os mesmos podem assim infestar ninhos e filhotes nesta ocasião, transmitindo os patógenos (BUKER et al., 2013).

Quatro sequências relacionados a *Ehrlichia* spp. identificados nas aves de nosso

estudo foram estreitamente relacionadas a *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próxima de *E. chaffeensis* encontradas em cervídeos (*Blastocerus dichotomus* - DQ345720; *Mazama gouazoubira* - JF952894) e aves carnívoras (JN217093) no Brasil, assim como de uma sequência de *Ehrlichia chaffeensis* obtida de um isolado humano (M73222) dos Estados Unidos. No entanto, três sequências posicionaram-se em um ramo totalmente distinto na referida árvore. Possivelmente, este fato é explicado pela variabilidade genética dos agentes Anaplasmataceae em estudo. Enquanto o conhecimento sobre a ocorrência desses patógenos no Brasil baseia-se na detecção sorológica e / ou molecular de *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp. em seres humanos, aves, cervídeos, cães, gatos, canídeos e felídeos selvagens (CALIC et al 2004; COSTA et al 2005; MACHADO et al., 2012; MACHADO et al. 2006; SACCHI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015; ANDRÉ et al., 2014), nosso estudo destaca a participação das aves no ciclo epidemiológico desses patógenos, e a possibilidade de estabelecimento de novos focos de infecção entre os animais e Homem. Curiosamente, a transmissão transovariana de espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* não foi demonstrada, de modo que hospedeiros são necessários para manter o ciclo de vida do patógeno no ambiente (DUMLER et al., 2001).

Questionamentos a respeito do papel das aves como reservatórios e / ou portadores de patógenos transmitidos por carrapatos também têm sido realizados na América do Norte (DANIELS et al 2002; OGDEN et al. 2008), e na Europa (BJÖERSDORFF et al 2001; SPITALSKA et al 2006; IOANNOU et al. 2009; HILDEBRANDT et al., 2010). Alguns relatos apontam as aves como somente carreadoras de carrapatos infectados com *A. phagocytophilum*, pois o agente foi detectado em ninfas parasitando aves amostradas na Suécia (BJÖERSDORFF et al., 2001), Rússia (ALEKSEEV et al., 2001), Canadá (OGDEN et al. 2008) e Alemanha (HILDEBRANDT et al. 2010). A não confirmação da detecção de *A. phagocytophilum* em larvas sugere que as aves não são uma importante fonte de infecção de carrapatos, atuando como reservatórios incompetentes (BJÖERSDORFF et al., 2001). *A. phagocytophilum* foi detectada em larvas de *Ixodes scapularis* recolhidas de exemplares de *Catharus fuscens* e *Turdus migratorius*, no estado de Nova York, EUA

(DANIELS et al., 2002), mas os autores não descartaram a possibilidade de que a aquisição do patógeno ocorreu via “cofeeding” (co-alimentação) com ninfas infectadas anteriormente. De forma semelhante, Lommano et al. (2014), na Suíça, relataram que aves do gênero *Turdus* foram as mais parasitadas por carrapatos, e também aquelas que carregavam maior número de carrapatos PCR positivos aos agentes estudados (*A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp). Os autores, no entanto, também não descartaram a possibilidade da ocorrência de *co-feeding* (coalimentação), apesar de as larvas que se alimentaram juntamente com as ninfas apresentarem a mesma taxa de infecção que as larvas fixadas sem a presença de ninfas (16,3% e 17,9%, respectivamente); eles consideraram a possibilidade de que as ninfas poderiam ter infectado as larvas e abandonado o hospedeiro antes da captura do mesmo.

No Brasil, Machado et al. (2012) também relataram a identificação de *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próxima a *E. chaffeensis* e *E. canis* e *Anaplasma* spp. filogeneticamente próximo a *A. phagocytophilum* em *Polyborus plancus*, *Coragyps atratus* e *Falco sparverius*, suscitando questionamentos sobre a disseminação de destes patógenos por aves carnívoras. Desta forma, mais estudos devem ser realizados, sobretudo infecções experimentais e isolamento dos agentes envolvidos, visando avaliar o papel desempenhado por estas aves no ciclo epidemiológico destes patógenos.

Na pesquisa de hemosporídeos, as aves PCR positivas para *Haemoproteus* spp. foram corujas-do-mato (*Megascops choliba*) provenientes do ambulatório veterinário da Associação Mata Ciliar (AMC), em Jundiá-SP. Considerando que esta instituição recebe, geralmente, aves enfermas, machucadas ou apreendidas pela Polícia Ambiental geralmente sob condições estressantes, podemos sugerir que estas aves, por estarem infectadas previamente e provavelmente debilitadas, foram expostas à situações de risco que as levaram à AMC. De forma semelhante, Santos et al (2008) também obtiveram maior ocorrência de hemosporídeos em aves da Ordem Strigiformes, quando pesquisaram estes patógenos em aves de rapina no cativeiro em Portugal.

Aves infectadas com hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* spp. e

*Haemoproteus* spp. podem apresentar-se letárgicas, anoréxicas, com olhos fechados e cabeça caída, podendo ocorrer também dispneia, regurgitação e morte, na fase aguda da doença (VALKIUNAS 2005). Já o estágio crônico apresenta-se subclínico na maioria dos casos, porém condições estressantes podem levar à recaídas e reagudização da doença (PALINAUSKAS et al., 2011). Assim, situações ou condições estressantes para as aves no cativeiro (mudança de ambiente, compartilhamento do mesmo espaço com outras corujas, etc) também podem ter propiciado a exacerbação da enfermidade. Além disso, as aves também podem ter sido expostas aos agentes no cativeiro, considerando a presença de outras aves infectadas e vetores no local. Hemosporídeos são transmitidos por várias espécies de mosquitos, sendo que a maioria dos parasitas relatados até o momento tem como vetores principais mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Mansonia* (VALKIUNAS 2005), dípteros relativamente comuns em todo o Brasil. Em relação à ave PCR positiva para *Plasmodium* spp., tratou-se de um gavião pomba (*Ictinia plumblea*) atendido no AASHVGLN, da FCAV – UNESP – Jaboticabal. Esta ave, de forma semelhante às hipóteses levantadas para as corujas, pode ter sido exposta previamente à infecção ou então no próprio cativeiro (internação). Nas infecções por Haemosporida em aves, devemos salientar que apesar de serem considerados agentes de baixa patogenicidade, redução na produtividade e até mesmo alta mortalidade por essas infecções parasitárias tem sido relatada. Provavelmente, o impacto mais significativo sobre as aves hospedeiras ocorra a longo prazo sobre o sistema reprodutivo, acarretando decréscimo da população (ELAHI et al., 2014). Nesse aspecto, descobriu-se recentemente que a infecção crônica causada pelos hemosporídeos representados pelos agentes *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., promove o encurtamento dos telômeros, e então as células morrem, acumulando danos nos tecidos e provocando disfunções nos órgãos. Esses fatores reduzem o tempo de vida das aves, interferindo no sucesso reprodutivo e na propagação da espécie (ASGHAR et al., 2015). Estes fatores combinados reforçam a hipótese de que as aves PCR positivas para hemosporídeos nesta pesquisa encontravam-se previamente infectadas, antes de chegarem ao cativeiro. Deve-se considerar também que as infecções, em geral, tornam-se crônicas, o que reduz significativamente o número de

parasitas na corrente sanguínea das aves. Assim, não encontramos parasitas nos esfregaços sanguíneos analisados, existindo também a possibilidade de haver amostras falso-negativas na PCR convencional.

No estado de São Paulo, uma pesquisa sobre a ocorrência de hemosporídeos em 3449 aves, utilizando apenas a análise de esfregaços sanguíneos, foram obtidas prevalências de até 1,8% para *Plasmodium* spp. e 3,5% para *Haemoproteus* (BENNETT & LOPES, 1980); quando a amostragem atingiu mais de 15.000 aves, 3,2% das mesmas mostraram-se positivas para *Haemoproteus* spp. e 0,6% para *Plasmodium* spp. Vale ressaltar que a técnica utilizada na pesquisa dos hemoparasitas em ambos os estudos citados foi unicamente a análise de esfregaços sanguíneos em microscopia de luz. Em geral, estudos que combinam a análise de esfregaços sanguíneos e PCR obtém maior porcentagem de aves positivas, com prevalências de até 100% para *Plasmodium* spp. em diferentes regiões do Brasil (BUENO et al., 2010; LIMA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2005; BELO et al., 2009, citados por BRAGA et al., 2011).

Além desses fatores, há de considerar que existem diferenças entre as espécies na susceptibilidade às mais variadas doenças, além de diferenças na susceptibilidade entre indivíduos da mesma espécie. Diferenças na prevalência de infecções por *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* em corujas do gênero *Strix* foram demonstradas por Ishak et al. (2008). Os autores, nesse estudo, sugerem que um dos fatores que permite a expansão de território por *Strix varia* é a baixa susceptibilidade da mesma à infecção por hemosporídeos, o que não ocorre com indivíduos da espécie *Strix occidentalis* e suas subespécies (mais susceptíveis à infecção por estes parasitas). A susceptibilidade de diferentes hospedeiros também está relacionada a diferentes isolados geográficos do parasita e sua virulência para cada hospedeiro. A infecção por *Plasmodium juxtannucleare* em galinhas domésticas, por exemplo, é marcada por baixos níveis de parasitemia e poucas alterações clínicas nestas aves. A mesma espécie de parasita, no entanto, causou desordens clínicas severas e morte em vários pinguins em reabilitação na África. A maior susceptibilidade dos pinguins pode ser explicada pela baixa imunidade aos parasitas, uma vez que estas aves habitam ambientes frios onde há ausência de vetores e não ocorre comumente a transmissão

ativa da malária (GRIM et al., 2003; VALKIUNAS et al., 2005; BRAGA et al., 2011).

Os hemosporídeos aqui estudados são representados por várias espécies e subespécies, e diversas linhagens são relatadas em todo o mundo. A diversidade genética entre as linhagens dos hemoparasitas em estudo interferem enormemente no diagnóstico específico, sobretudo quando apenas é utilizado o diagnóstico molecular (VALKIUNAS et al., 2011). Na análise filogenética do DNA de *Haemoproteus* spp., baseada no gene mitocondrial citocromo b, as sequências de *Haemoproteus* spp. encontradas nas aves sob estudo, posicionaram-se no mesmo grande ramo que as sequências de *Haemoproteus pallidus* (DQ630004.1), *H. parabelopolskyi* (KM361478.1), *H. belopolskyi* (DQ630006.1), *H. lanii* (DQ630012.1), *H. micronuclearis* (HQ386236.1), *H. homobelopolskyi* (HQ386241.1), *H. nucleofascialis* (HQ386243.1), *H. majoris* (AF254977.1), *H. paranucleophilus* (HQ386242.1) e *H. balmorali* (DQ630014.1) previamente depositadas no Genbank, porém formaram um ramo distinto dentro deste grande ramo, o que não permite a identificação específica do parasita encontrado. De forma semelhante, a sequência do fragmento do gene mitocondrial citocromo b de *Plasmodium* spp. foi posicionada no mesmo ramo das sequências parciais (gene citocromo b) de *Plasmodium elongatum* (JX029877), *P. ashfordi* (AF254962) e *P. nucleophilum* (KM365040). A grande variabilidade genética desses parasitas associada à utilização de genes conservados e de fragmentos de pequeno tamanho no diagnóstico (480 pb), nos remete, em geral, à baixa robustez nos valores de bootstrap, o que dificulta inferir um posicionamento genético acurado. Essa mesma consideração é válida na análise filogenética de Anaplasmataceae neste estudo (fragmentos de 358 pb e 410 pb).

Apesar de *Bartonella* spp. não ter sido identificada nas amostras em estudo, sabe-se que o DNA de duas espécies patogênicas de *Bartonella* spp (muito semelhantes a *B. henselae* e *B. koehlerae*) foi identificado no sangue de aves migratórias, pertencentes à 19 espécies diferentes, na Carolina do Norte, Estados Unidos. Em relação à identificação do agente nos carrapatos recolhidos das aves, os resultados obtidos nesta pesquisa são corroborados por Molin et al. (2011) e Toma et al (2014), que não encontraram carrapatos infectados com *Bartonella* spp. recolhidos de

aves migratórias em ilhas no Mediterrâneo e na região central da Itália, respectivamente.

Vale ressaltar que a maioria das pesquisas envolvendo aves e a disseminação de patógenos privilegia a detecção dos agentes nos carrapatos recolhidos das aves, e poucos estudos realizam a amostragem de sangue ou vísceras desses animais. Além disso, existem poucas pesquisas dedicadas ao isolamento dos agentes com caracterização molecular dos mesmos e realização de infecções experimentais, o que nos remete à questionamentos sobre o real papel desempenhado pelas aves no ciclo epidemiológico dos patógenos referidos. Somente com a realização de estudos mais aprofundados será possível a identificação de animais reservatórios, o reconhecimento de novas espécies de patógenos e a avaliação do impacto da disseminação das enfermidades nos ecossistemas, sobretudo no que se refere à saúde humana e animal.

## 7. CONCLUSÕES

- As aves carnívoras estão expostas à infecção por agentes da Família Anaplasmataceae e Ordem Haemosporida, sendo que a frequência de aves infectadas pelos referidos patógenos e infestadas por carrapatos é baixa;

- A RIFI mostrou-se falha na detecção de anticorpos de amostras PCR positivas e a análise de esfregaços sanguíneos das aves mostrou-se pouco sensível na detecção dos patógenos;

- As aves PCR positivas para *Ehrlichia* spp. e *Haemoproteus* spp. foram majoritariamente corujas amostradas no cativeiro enquanto que as aves PCR positivas para *Anaplasma* spp. foram majoritariamente de vida livre.

## 8. REFERÊNCIAS

ALEKSEEV, A.N.; DUBININA, H.V.; VAN DE POL, I.; SCHOOLS, L.M. Identification of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. **Clinical Microbiology**, v. 39, n.6, p.2237-2242, 2001.

ANDERSON, B.E. & NEUMAN, M.A. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.203-219, 1997.

ANDRÉ, M.R.; BACCARIM DENARDI, N.C.; MARQUES DE SOUSA, K.C.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P.C.; GROSSE ROSSI ONTIVERO, C.R.; LIMA GONZALEZ, I.H.; CABRAL NERY, C.V., FERNANDES CHAGAS, C.R., MONTICELLI, C.; ALEXANDRE DE SANTIS, A.C., MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n.5, p. 545-551, 2014.

ANDRÉ, M.R. **Detecção sorológica e caracterização moleculares de agentes Anaplasmataceae, micoplasmas hemotróficos, piroplasmas e Hepatozoon sp. em carnívoros selvagens mantidos em cativeiro no Brasil.** 209 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; SCORPIO, D.G.; TEIXEIRA, R.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.3, n.4, p. 247-253, 2012.

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

ASGHAR, M.; HASSELQUIST, D.; HANSSON, B.; ZEHTINDJIEV, P.; WESTERDAHL, H.; BENSCH, S. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. **Science**, v. 347, p. 436-438, 2015.

BELO, N. O.; PASSOS, L.F.; JÚNIOR, L.M.; GOULART, C.E.; SHERLOCK, T.M.; BRAGA, E.M. Avian malaria in captive psittacine birds: detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p.220-224, 2009.

BENNETT, G. F. & LOPES, O. S. Blood parasites of some birds from São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n.1-2, p. 117-134, 1980.

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

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R.T. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1452, p. 1583-1589, 2000.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinical microbiology**, v.41, n.9, p.4172-4177, 2003.

BJÖERSDORFF, A.; BERGSTROM, S.; MASSUNG, R.F.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 877–879, 2001.

BOTÃO-MIRANDA, R.A.; STORNI, A.; RITTER, P.D. et al. Parasitismo por carrapatos em algumas aves capturadas na Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Patologia**, v.37, p.226, 2001.

BRAGA, E.M.; SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; VALKIUNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.1, p.3-11, 2011.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; SAITO, T.B.; MAGGI, R.G.; BLANTON, L.S.; BOUYER, D.H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites & Vectors**, v.1, n. 7, p. 298, 2014.

BUENO, M.G.; LOPEZ, R.P.; MENEZES, R.M.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G.F.; ARAÚJO, R.A.; GUIDA, F.J.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.123-127, 2010.

BÜKER, M.; PICOZZI, K.; KOLB, S.; HATT, J-M. First detection of *Borrelia burgdorferi*-antibodies in free living birds of prey from Eastern Westphalia, Germany. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 155, n. 7, p.1-6, 2013.

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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 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. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 664-668, 2006.

CARVALHO FILHO,E.M.; CARVALHO,C.E.A.; CARVALHO, G.D.M.; ZORZIN, G. Anilhamento e Técnicas de Capturas de Falconiformes no Estado de Minas Gerais. **Ornithologia**, v. 1, n.1, p.19-23, 2005.

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

CHAUZAT, M.P.; MARTEL, A.C.; COUGOULE, N.; PORTA, P.; LACHAIZE, J.; ZEGGANE, S.; AUBERT, M.; CARPENTIER, P.; FAUCON, J.P. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n.1, p.103-111, 2011.

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; KASTEN, R.W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R.J.; KOEHLER, J.E.; DEHIO, C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. **Veterinary Research**, v.40, n.2, p.29, 2009.

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

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

COIMBRA, H. S.; FERNANDES, C. G.; SOARES, M. P.; MEIRELES, M. C. A.; RADAMÉS, R.; SCHUCH, L. F. D. Ehrlichiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 853-859, 2005.

COSTA, P. S. G.; VALLE, L. M. C.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 1, 2006.

COWAN, G. Rickettsial diseases: the typhus group of fevers – a review. **Postgrad Med. J.**, v. 76, p.269–272, 2000.

DANIELS, T.J.; BATTALY, G.R.; LIVERIS, D., et al. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p. 1524–1525, 2002.

DAVIS, A.K.; DEVORE, J.L.; MILANOVICH, J.; CECALA, K.; MAERZ, J.C.; YABSLEY, M.J.; New Findings from an Old Pathogen: Intraerythrocytic Bacteria (Family Anaplasmataceae) in Red-Backed Salamanders *Plethodon cinereus*. **EcoHealth**, v.6, p. 219–228, 2009.

DEHIO, C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.365-390, 2004.

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

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

DUMLER, J. S. *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Washington, v. 1063, p.361-373, 2005.

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

ELAHI, R.; ISLAM, A.; HOSSAIN, M. S.; MOHIUDDIN, K.; MIKOLON, A.; PAUL, S. K.; HOSSEINI, P. R.; DASZAK, P.; ALAM, M. S. Prevalence and Diversity of Avian Haematozoan Parasites in Wetlands of Bangladesh. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 12 pages, 2014.

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

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p. 175-185, 1998.

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

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. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 3074-3078, 2006.

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. **Cadernos de 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. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 203-212, 2005.

GRIM, K.C.; VAN DER MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; MC CUTCHAN, T.F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, p.250-255, 2003.

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

HALL, T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, n.41, p. 95-98, 1999.

HALOS, L.; JAMAL, T.; MAILLARD, R.; GIRARD, B.; GUILLOT, J.; CHOMEL, B.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BOULOUIS, H-J. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.10, p.6302-6305, 2004.

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

HARMS, A. & DEHIO, C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, n.1, p.42-78, 2012.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a *Rickettsia*-Like Agent in Dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O.; SCORPIO, D.; DUMLER, J. S.; MANKOWSKI, J. Suspected cases of *Neorickettsia*-like organisms in Brazilian dogs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Washington, v. 1026, p. 79-83, 2004.

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

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

HEIDENREICH, M. Greifvögel – Krankheiten, Haltung, Zucht. Berlin and Wien, Blackwell Wissenschafts-Verlag. 1995.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v.90, n.4, p. 797-802, 2004.

HILDEBRANDT, A.; FRANKE, J.; MEIER, F. et al. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. ticks. **Tick Borne Diseases**, v.1, p.105–107, 2010.

IOANNOU, I.; CHOCHLAKIS, D.; KASINIS, N.; ANAYIOTOS, P.; LYSSANDROU, A.; PAPADOPOULOS, B.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.2, p.158-160, 2009.

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

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

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

ISHAK, H. D.; DUMBACHER, J. P.; ANDERSON, N. L.; JOHN J. KEANE, J. J.; VALKIUNAS, G.; HAIG, S. M.; TELL, L. A.; SEHGAL, R. N. M. Blood Parasites in Owls with Conservation Implications for the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). **Plos One**, v.3, p. 1-10, 2008.

JOHNSTON, E.; TSAO, J.I.; MUÑOZ, J.D.; OWEN, J. *Anaplasma phagocytophilum* infection in American robins and gray catbirds: an assessment of reservoir competence and disease in captive wildlife. **Journal of Medical Entomology**, v.50, n.1, p. 163-170, 2013.

KANG, J.G.; KIM, H.C.; CHOI, C.Y.; NAM, H.Y.; CHAE, H.Y.; CHONG, S.T.; KLEIN, T.A.; KO, S.; CHAE, J.S. Molecular detection of *Anaplasma*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in ticks collected from migratory birds from Hong-do Island, Republic of Korea. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.13, n.4, p.215-225, 2013.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 9, p. 5766-7576, 2006.

KOEHLER, J.E.; SANCHEZ, M.A.; TYE, S.; GARRIDO-ROWLAND, C. S.;1, CHEN, F. M.; MAURER, T.; COOPER, J. L.; OLSON, J. G.; REINGOLD, A. L.; HADLEY, W. K.; REGNER, R. R.; TAPPERO, J. W. Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. **Clinical Infectious Disease**, v.37, n.4, p.559-566, 2003.

KRUSZEWSKA, D. & TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S. Unknown species of rickettsiae isolated from *Ixodes ricinus* tick in Walcz. **Rocz Akad Med Bialymst**, v.41, n.1, p.129-135, 1996.

LAPOINTE, D. A., ATKINSON, C. T.; SAMUEL, M. D. Ecology and conservation biology of avian malaria, **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1249, no. 1, pp. 211–226, 2012.

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

LIMA, M. R.; SIMPSON, L.; FECCHIO, A.; KYAW, C.M. Low prevalence of haemosporidian parasites in the introduced house sparrow (*Passer domesticus*) in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 55, p.297-303, 2010.

LIU, Q.; EREMEEVA, M.E.; LI, D. *Bartonella* and *Bartonella* infections in China: From the clinic to the laboratory. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, n.2, p.93-102, 2012.

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

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 1681-1686, 1997.

LOMMANO E., DVOŘÁK C., VALLOTTON L., JENNI L., GERN L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 5, n.6, p. 871-882, 2014.

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

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

MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; WERTHER, K.; SOUSA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JÚNIOR, J. R. F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.8, p. 705-708, 2012.

MAGALHAES, R.F.; PITASSI, L.H.U; LANIA, B.G.; BARJAS-CASTRO, M.L.; VELHO, P.E.N.F. Bartonellosis as cause of death after red blood cell unit transfusion. **Ultrastructural Pathology**, v.33, n.0, p.151-154, 2009.

MANNELLI, A.; BOGGIATTO, G.; GREGO, E.; CINCO, M.; MURGIA, R.; STEFANELLI, S.; DE MENEGHI, D. ; ROSATI, S.; Acarological risk of exposure to agents of tick-borne zoonoses in the first recognized Italian focus of Lyme borreliosis. **Epidemiology & Infection**, v.131, n.3, p. 1139–1147, 2003.

MASCARELLI, P.E.; MCQUILLAN, M.; HARMS, C. A.; HARMS, R.V.; BREITSCHWERDT, E. B. *Bartonella henselae* and *B. koehlerae* DNA in Birds. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.3, p. 490-492, 2014.

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

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

MCGILL, S.; WESSLEN, L.; HJELM, E.; HOLMBERG, M.; AUVINEN, M.K.; BERGGREN, K.; GRANDIN-JARL, B.; JOHNSON, U.; WIKSTRÖM, S.; FRIMAN, G. *Bartonella* spp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.37, p. 723-730, 2005.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA, pp 1 – 8, 2010.

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, p. 95-103, 2002.

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

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

MOKHTAR, A.S. & TAY, S.T. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae* in fleas from domestic dogs and cats in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.85, n.5, p.931-933, 2011.

MOLIN, Y.; LINDEBORG, M.; NYSTRÖM, F.; MADDER, M.; HJELM, E.; OLSEN, B.; JAENSON, T.G.T.; EHRENBORG, C. Migratory birds, ticks, and *Bartonella*. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 1, 2011.

MOSEPELE, M.; MAZO, D.; COHN, J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

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

OGDEN, N. H.; LINDSAY, L. R.; HANINCOVA, K.; BARKER, I. K.; BIGRAS-POULIN, M.; CHARRON, D. F.; HEAGY, A.; FRANCIS, C. M.; O'CALLAGHAN, C. J.; SCHWARTZ, I.; THOMPSON, R. A. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 74, n. 6, p. 1780–1790, mar. 2008.

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. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.1, p.37-64, 2003.

PALINAUSKAS, V.; VALKIŪNAS, G.; BOLSHAKOV, C.V.; BENSCH, S. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): the effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. **Experimental Parasitology**, v.127, p.527-533, 2011.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.3, p.469-92, 2005.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

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

PERSING, D.H. PCR protocols for emerging infectious diseases. **A supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C.: ASM Press, 1996, 180 p.

PITASSI, L.H.U. ***Bartonella* spp. e o risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea**. 2013. 153 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PRAKASH, J.A.J.; RELLER, M.E.; BARAT, N.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 292-293, 2009.

PUSTERLA, N.; CHANG, C.C.; CHOMEL, B.B.; CHAE, J.S.; FOLEY, J.E.; DEROCK, E.; KRAMER, V.L.; LUTZ, H.; MADIGAN, J.E. Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.36, n3, p.494-9, 2000.

PUSTERLA, N.; 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. **Journal of Helminthology**, London, v. 77, n. 4, p. 335-339, 2003.

RAMASAMY, R. Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. **Front Public Health**, v.18; n.2, p.123, 2014.

REEVES, W.K.; NELDER, M.P.; COBB, K.D.; DASCH, G.A. *Bartonella* spp. in deer keds, *Lipoptena mazamae* (Diptera: Hippoboscidae), from Georgia and South Carolina, USA. **Journal of Wildlife Disease**, v.42, n.2, p.391-396, 2006.

RELLER, M.E.; CLEMENS, E.G.; PRAKASH, J.A.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. In: **23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology**. Hilton Head Island, SC; 2009: Abstract no. 51.

RIBEIRO, S.F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F.C.S.; BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerini birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v.3, p.261-267, 2005.

RISTIC, M. & HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkings, p. 704-709, 1984.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, M.B.A. Serological diagnosis of canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunology**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

RIZZOLI, A.; ROSA, 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.

ROLAIN, J.M.; BROUQUI, P.; KOEHLER, J.E.; MAGUIÑA, C.; DOLAN, M.J.; RAOULT, D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, 1921-1933, 2004.

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.

SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J.S.; ANDRADE, G.M.; BALDANI, C.D.; MACHADO, RZ. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.3, p.135-140, 2010.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D., THOME, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.23, n.4, p.770-774, 2011.

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

SANTOS, N. G.; PEREIRA, M. C.; MELO, P. M.; MADEIRA DE CARVALHO, L. M. Pesquisa de hemoprotozoários em aves de rapina (ordens Falconiformes e Strigiformes) em centros de recuperação em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.103, n.567-568, p.195-200, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, n.4, p.193-209, 2001.

SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; RIBEIRO, M.F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, n.4, p.353-360, 2012.

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

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

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.37, n.2, p.119-125, 1976.

SPITALSKÁ, E.; LITERÁK, I.; SPARAGANO, O.A.; GOLOVCHENKO, M.; KOCIANOVÁ, E. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. **Wien Klin Wochenschr**, v.118, n. 23-24, 759-764, 2006.

SRETER-LANCZ, Z.; TORNYAI, K.; SZELL, Z.; SRÉTER, T.; MÁRIALIGETI, K. *Bartonella* infections in fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and lack of bartonellae in ticks (Acari: Ixodidae) from Hungary. **Folia Parasitologica**, v.53, n.4, p.313-316, 2006.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. **Systematic Biology**, v.75, n.5, p.758-771, 2008.

STÖVER, B. C. & MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v.11, p.7, 2010.

STORNI, A.; ALVES M.A.S.; VALIM, M.P. Ácaros de penas e carrapatos (Acari) associados a *Turdus albicollis*, Vieillot (Aves, Muscicapidae) em uma área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.419-423, 2005.

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

SUMNER, J.W.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p.2087-2092, 1997.

SUN, J.; LIU, Q.; LU, L.; DING, G.; GUO, J.; FU, G.; ZHANG, J.; MENG, F.; WU, H.; SONG, X.; REN, D.; LI, D.; GUO, Y.; WANG, J.; LI, G.; LIU, J.; LIN, H. Coinfection with four genera of bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* ticks from China. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.6, p.791-795, 2008.

TAMÍ, I. DEL. C. DE.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. em las plaquetas de pacientes com infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

TAY, S.T.; MOKHTAR, A.S.; ZAIN, S.N.; LOW, K.C. Isolation and molecular identification of Bartonellae from wild rats (*Rattus* species) in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.90, n.6, p.1039-1042, 2014.

TEIXEIRA, R.H.F; FERREIRA, I.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S.; SERRA-FREIRE, N.M. Ticks em wild fowls at Sorocaba – São Paulo State, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1277-1280, 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Acid Nucleics Research**, v.22, p.1673-4680, 1994.

TOMA, L.; MANCINI, F.; DI LUCA, M.; CECERE, J.G.; BIANCHI, R.; KHOURY, C.; QUARCHIONI, E.; MANZIA, F.; REZZA, G.; CIERVO, A. Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 3, p. 199-205, 2014.

TSAI, Y.L.; CHANG, C.C.; CHUANG, S.T.; CHOMEL, B.B. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.34, n.4, p.299-314, 2011.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3888-3895, 1999.

VÁCLAV, R.; FICOVÁ, M.; PROKOP, P.; BETÁKOVÁ, T. Associations between coinfection prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in hard ticks feeding on reptile hosts. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 245–253, 2011.

VALENTINE, K.H.; HARMS, C.A.; CADENAS, M.B.; BIRKENHEUER, A.J.; MARR, H.S.; BRAUN-MCNEILL, J. et al. *Bartonella* DNA in loggerhead sea turtles. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.949-950, 2007.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**, CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p., 2005.

VALKIŪNAS, G.; ASHFORD, R.W.; BENSCH, S.; KILLICK-KENDRICK, R.; PERKINS, S. A cautionary note concerning *Plasmodium* in apes. **Trends in Parasitology**, v.27, p.231-232, 2011.

VENZAL, J.M.; FÉLIX, M.L., OLMOS, A. et al. A Collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. **Experimental and Applied Acarology**, v.36, p.325-331, 2005.  
 VITALIANO, S. N.; MINEO, T.W.P.; ANDRÉ, M.R; MACHADO, R.Z.; MINEO, J.R.; WERTHER, K. Experimental infection of Crested Caracara (*Caracara plancus*) with *Toxoplasma gondii* simulating natural conditions. **Veterinary Parasitology**, v.172, p. 71-75, 2010.

WALKER, D.H. & DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, n.1, p.18-29, 1996.

WALKER, D.H.; PADDOCK, C.D.; DUMLER, J.S. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 92, p.1345-1361, 2008.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEUSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.1, p.1-15, 2001.

WEN, B.; CAO, W; PAN, H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 990, p. 45-53, 2003.

WOOD, H. & ARTSOB, H. Spotted Fever Group Rickettsiae: A Brief Review and a Canadian Perspective. **Zoonoses Public Health**, v. 59, n. 2, p. 65–79, 2012.

WOODWORTH-LYNAS, C.B.; CAINES, J.R.; BENNETT, G.F. Prevalence of avian Haematozoa in São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p.515-526, 1989.

WORMSER, G.P.; DATTWYLER, R.J.; SHAPIRO, E.D.; HALPERIN, J.J.; STEERE, A.C.; KLEMPNER, M.S.; KRAUSE, P.J.; BAKKEN, J.S.; STRLE, F.; STANEK, G.; BOCKENSTEDT, L.; FISH, D.; DUMLER, J.S.; NADELMAN, R.B. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, Human Granulocytic

Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.43, n.9, p. 089-1134, 2006.

YU, X.; MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, n.3-4, p.337-346, 2006.

ZHANG, J.; POPOV, V.L.; GAO, S.; WALKER, D.H.; YU, X. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.9, n.3, p.610-618, 2006.