

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Ocorrência de *Hepatozoon* spp., Piropasmas, *Ehrlichia* spp. e filarídeos em mamíferos silvestres de Centros de Triagem de Minas Gerais e Goiás

Talita Silva Alves

Uberlândia-MG
Outubro, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre.

Talita Silva Alves

Aluna

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

Orientadora

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Coorientador

Uberlândia

Outubro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A474o
2017 Alves, Talita Silva, 1991
 Ocorrência de Hepatozoon spp., Piroplasmas, Ehrlichia spp. e
 filarídeos em mamíferos silvestres de Centros de triagem de Minas
 Gerais e Goiás / Talita Silva Alves. - 2017.
 89 p. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.

Coorientador: Sydnei Magno da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.6>

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Mamíferos - Teses. 3. Microscopia óptica -
Teses. 4. Reação em cadeia da polimerase - Teses. I. Cury, Márcia
Cristina. II. Silva, Sydnei Magno da. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa da Dissertação de Mestrado número 237 do PPIPA.

Data: 27 de outubro de 2017

Discente: TALITA SILVA ALVES

Matricula: 115221PA009

Título do Trabalho: "Identificação morfológica e molecular de *Hepatozoon spp.* e piroplasmas em mamíferos silvestres de diferentes procedências"

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Às 9 horas do dia 27 de outubro do ano de 2017 no Bloco 4L sala B22 - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Dr. Marcos Gomes Lopes - USP, Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó - FAMEV/UFU e Profa. Dra. Márcia Cristina Cury - ICBIM/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da banca Dra. Márcia Cristina Cury apresentou a comissão examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público e concedeu ao(à) discente a palavra para exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

Esta defesa de dissertação é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU, e do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa desta Universidade.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 38 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela banca examinadora.

Dr. Marcos Gomes Lopes - USP

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó - FAMEV/UFU

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury (orientadora) - ICBIM/UFU

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

TALITA SILVA ALVES

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Parasitologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Dr. Marcos Gomes Lopes

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e os humildes.

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À Deus, Protetor e Guia, pela condução da minha vida nos melhores caminhos.

À mãe, papai e Tati, pelo incentivo, amor e afeto incondicional. A vocês, todo meu amor e gratidão. Dedico a vocês, este trabalho.

Ao Miguel, por chegar na metade deste mestrado, tornando meus dias mais alegres e cheios de cor.

Ao Pedro, pelo amor, carinho e segurança que me transmitiu em todos os momentos e, com sua serenidade, me ajudou a enfrentar as dificuldades que apareceram durante este tempo de mestrado. Dedico este trabalho e comemoro esta vitória com você.

À Márcia Cury, minha orientadora, pela sua acolhida desde o primeiro e-mail que te mandei, dizendo que queria ser sua aluna. Agradeço por ter me confiado este trabalho, por compartilhar um pouco de sua sabedoria e inteligência comigo, me fazendo pensar de forma mais objetiva, tirando os “inferir, assim, já, um e uma, além disso” dos meus textos. Obrigada pela paciência, leveza e risos nos últimos dias de escrita dessa dissertação.

À Natália Nasser, pelo auxílio fundamental que me deu na execução de todas as partes deste trabalho, em especial, à análise molecular. Lembro-me que quando estava escrevendo meu projeto você disse: “nós vamos fazer isso dar certo”. Foi assim: desde a bancada à escrita, ficando ao meu lado até quando todos se cansaram de esperar por meu examinador de banner, no congresso (você se lembra?). Agradeço, pois você se alegrou comigo quando minhas PCRs davam certo, ouviu desabafos de momentos não tão felizes e sempre tinha uma palavra sábia para dar. Obrigada por ter sido minha grande parceira neste mestrado. Sua amizade eu levo para a vida e este trabalho, eu te dedico, porque ele é seu também.

Ao Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva pelo aceite em ser coorientador deste projeto e pelo auxílio que me deu ao longo da execução deste trabalho.

Ao Professor Marcelo Labruna, pelo aceite em colaborar com a execução das análises moleculares deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Gomes Lopes, pela supervisão em toda execução da parte molecular deste trabalho, na USP. Agradeço também por sua vontade em querer melhorar esse estudo e pelos conhecimentos que me passou, que foram tão importantes para que eu crescesse. Conhecê-lo e trabalhar contigo foi um grande presente que o mestrado me deu.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação, pelos ensinamentos que transmitiram no período das disciplinas do mestrado.

Às “Lus”, da secretaria do PPIPA e à Ana Paula (Comut/ICB- UFMG), por todo auxílio que me deram durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Matias Szabó, pela autorização concedida para identificar os carrapatos deste trabalho em seu laboratório, juntamente com seus alunos Rodrigo e Jaciara, pelos ensinamentos que me passou na qualificação, que foram importantes para a construção desta análise e pelo aceite ao participar da minha banca.

Aos professores Dra. Karine e Dr. César, pelo auxílio em momentos críticos de execução deste trabalho, que somente foi possível continuar com a ajuda de vocês. Vocês são como anjos e jamais poderei retribuir à altura o que fizeram por mim.

Aos colaboradores deste projeto: Daniel Vilela, Erica e toda equipe de médicos veterinários e estagiários do CETAS-BH. Ao Luciano de Paula Silva e toda sua equipe de estagiários e tratadores de animais silvestres do CETAS-GO e ao Prof. Dr, André Quagliatto Santos e sua equipe de médicos veterinários residentes e estagiários do LAPAS, em especial aos residentes Leonardo, Carol, Débora e Bianca, sou imensamente grata. Sem a autorização, a boa vontade, sempre se lembrando de mim quando chegavam os animais, e pela prestatividade ao colaborar com este projeto, este trabalho não teria sido realizado.

Por fim, e não menos importantes, gostaria de agradecer à Kelem, Letícia, Maria Júlia, Camila e ao Douglas, por todo auxílio que precisei durante o mestrado, sendo a todo momento, abertos a me ajudar. Obrigada pelos momentos de descontração e pela viagem que fizemos. Foram momentos inesquecíveis que passamos juntos e para sempre estarão em meu coração.

RESUMO

Hemoparasitos do filo Apicomplexa merecem destaque devido ao impacto que podem ter na conservação da biodiversidade dos mamíferos. O presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de agentes Piroplasmida (*Cytauxzoon*, *Theileria* e *Babesia*) e *Hepatozoon* spp., utilizando o Exame Microscópico Convencional (EMC) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e identificar os carrapatos presentes em mamíferos silvestres destinados ao LAPAS-UFU, CETAS-GO/IBAMA e CETAS-BH/IBAMA. Obteve-se 152 amostras de sangue total e realizou-se a PCR para *Hepatozoon* spp., com a utilização dos *primers* HepF300/Hep900, Hep2F/Hep2R e HAM-1/HPFR2, e para a ordem Piroplasmida, realizou-se a PCR com auxílio dos *primers* BAB- 33-47/ BAB432-439, PIRO 1F/PIRO 5R. Com punção de sangue periférico, confeccionou-se 352 extensões de 123 animais. Pelo EMC, não foram observados gamontes de *Hepatozoon* spp., mas pela PCR obteve-se 5,2% de positividade (oito positivos). Foram obtidos quatro novos haplótipos de *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon felis* nos mamíferos de espécies lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), irara (*Eira barbara*) e onça-parda (*Puma concolor*). Para os piroplasmas, pelo EMC e PCR, obteve-se 34,9% (43 animais positivos) e 26,3% (40 animais positivos), respectivamente. Foram obtidos três novos haplótipos de espécies de piroplasmas, sendo sequências similares à *Theileria cervi* em veado-catingueiro, *Theileria equi* em anta e *Cytauxzoon felis* em jaguatirica. Foram identificadas 432 espécimes, de 30 animais. Os carrapatos identificados foram: *Amblyomma nodosum*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *A. longirostre*, *A. dubidatum*, *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus*. Além disso, outros hemoparasitos foram observados em microscopia óptica, como *Ehrlichia* spp. em 23 animais (18,6%) e microfilárias em dois indivíduos de espécie *Coendou prehensilis* (ouriço-cacheiro). O conjunto de informações trazidas por este trabalho comprova a abundância de hemoparasitos que mamíferos brasileiros podem albergar. Além disso, algumas espécies de carrapatos identificados foram determinantes para inferir possíveis modos de transmissão de hemoparasitos observados nos animais. Sobre o resultado obtido pelo uso das técnicas de diagnóstico, a PCR, aliada ao sequenciamento, mostrou-se mais precisa que o EMC para identificação de espécies de hemoparasitos-alvo deste trabalho.

Palavras-chave: Hemoparasitos. Mamíferos silvestres. Microscopia óptica. Reação em Cadeia da Polimerase. Apicomplexa. Ixodidae.

ABSTRACT

Haemoparasites belonging to filum Apicomplexa deserve attention because can affect the conservation of mammals's biodiversity. This work aimed to avalue the occurence of Piroplasmida agents (*Cytauxzoon*, *Theileria* e *Babesia*) e *Hepatozoon* spp. using Convencional Microscopic Exam (CME) and Polymerase Chain Reaction (PCR) and indetify ticks on wild mammals belonging to LAPAS-UFU, CETAS-GO/IBAMA e CETAS-BH/IBAMA. On total, this work obtained 152 total blood samples that were submitted to PCR for *Hepatozoon* spp. with *primers* HepF300/Hep900, Hep2F/Hep2R e HAM-1/HPFR2, and for Piroplasmida agents, PCR was done using *primers* BAB- 33-47/ BAB432-439, PIRO 1F/PIRO 5R. To exam slides on optic microscope, was used peripheral samples of 123 mammals. There wasn't observed gamonts of *Hepatozoon* spp. on blood slides, but on PCR was observed prevalence of 5,2% (eight positive mammals). From these, was obtained four new haplotypes of *Hepatozoon* spp. like similar sequence of *Hepatozoon canis* in maned-wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and hoary fox (*Lycalopex vetulus*) and similar sequence of *Hepatozoon felis* in tayra (*Eira barbara*) and puma (*Puma concolor*). For Piroplasmida agents, the CME and PCR results were 34,9% (43 positive mammlas) and 26,3% (40 positive mammals), respectively. There was obtained three new haplotypes of Piroplasmida agents, being similar sequences of *Theileria cervi* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), similar sequence of *Theileria equi* in brazilian tapir (*Tapirus terrestris*) and similar sequence of *Cytauxzoon felis* in ocelot (*Leopardus pardalis*). There was identified 432 specimnes of ticks on 30 mammals. The species were *Amblyomma nodosum*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *A. longirostre*, *A. dubidatum*, *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus*. Besides this results, other haemoparasites were observed on optic microscope, like *Ehrlichia* spp. in 23 mammals (18,6%) and microfilaria in two mammals of the species *Coendou prehensilis* (brazilian porcupine). The information gathered by this work confirms the abundance of haemoparasites that the Brazilian mammals can harbor. In addition, some species of ticks identified were determinant to infer possible ways of transmitting hemoparasites identified in mammals. The result obtained by the use of molecular diagnostic techniques (PCR and sequencement) was more accurate than the CME for identification of hemoparasites on wild mammals of this work.

Palavras-chave: Haemoparasites. Wild mammal. Optic microscope. Polymerase Chain Reaction. Apicomplexa. Ixodidae.

LISTA DE ABREVIATURAS

C: Cativo

CEUA: Comitê de Ética Animal

CETAS: Centro de Triagem de Animais Silvestres

EMC: Exame Microscópico Convencional

FAMEV: Faculdade de Medicina Veterinária

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas

LAPAS: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres

n: Número de amostras

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SMF: Sistema Mononuclear Fagocítico

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

USP: Universidade de São Paulo

V: Voltagem

VL: Vida livre

%: Porcentagem/Por cento

µm: micrômetro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema geral das fases reprodutivas de parasitos pertencentes ao Filo Apicomplexa....	04
FIGURA 2: Equipamentos de contenção física utilizados nos mamíferos silvestres do estudo	22
FIGURA 3: Momento de utilização de anestésico nos mamíferos do estudo	23
FIGURA 4: Momento da coleta de sangue total de mamíferos silvestres do estudo	24
FIGURA 5: Material utilizado em coleta de sangue em ambiente aberto do CETAS-GO	25
FIGURA 6: Confeção e coloração de extensões sanguíneas	26
FIGURA 7: Gel de agarose de amostras positivas na PCR utilizando os primers Hep2F e Hep2R	35
FIGURA 8 Ilustração de piroplasma em extensão sanguínea de <i>Myrmecophaga tridactyla</i> (tamanduá-bandeira) procedente do LAPAS	38
FIGURA 9: Ilustrações de piroplasmas em extensões sanguíneas de mamíferos silvestres identificados pela microscopia óptica	38
FIGURA 10: Ilustrações de piroplasmas em extensões sanguíneas de mamíferos silvestres identificados pela microscopia óptica	39
FIGURA 11: Gel de agarose ilustrando amostras positivas na PCR utilizando os primers Piro 1F e Piro 5R	42
FIGURA 12: Inclusões em neutrófilos sugestivas para <i>Ehrlichia</i> spp. (setas) presentes em neutrófilos de mamíferos silvestres do estudo	43
FIGURA 13: Microfilárias visualizadas em extensão sanguínea de roedor silvestre de espécie <i>Coendou prehensilis</i> (ouriço-cacheiro) procedente do LAPAS - Aumento de 400x	44
FIGURA 14: <i>Amblyomma longirostre</i> coletado de ouriço-cacheiro (<i>Coendou prehensilis</i>) procedente do LAPAS	48
FIGURA 15: <i>Amblyomma ovale</i> em irara (<i>Eira barbara</i>) procedente do LAPAS	48
FIGURA 16: <i>Amblyomma sculptum</i> em <i>Tapirus terrestris</i> procedente do CETAS-GO	49
FIGURA 17: Identificação de carrapatos em tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) do LAPAS	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas nas reações de PCR	30
TABELA 2: Informações relativas às ordens, famílias e espécies dos mamíferos do estudo	33
TABELA 3: Espécies de mamíferos silvestres e respectivas procedências, que apresentaram positividade para <i>Hepatozoon</i> spp. pela PCR, com uso dos primers Hep2F e Hep2R.....	34
TABELA 4: Identidade das espécies de <i>Hepatozoon</i> em mamíferos silvestres de MG e GO	36
TABELA 5: Espécies de animais de três locais de coleta que foram positivos para agentes Piroplasmida, diagnosticados pelo exame microscópico	37
TABELA 6: Espécies de mamíferos que foram positivos para agentes Piroplasmida pela PCR utilizando os primers BAB-33-42/432-409	40
TABELA 7: Espécies de piroplasmas observados em mamíferos silvestres positivos na PCR utilizando os primers Piro 1F e Piro 5R, procedentes do LAPAS e CETAS-GO	42
TABELA 8: Principais gêneros e espécies de carrapatos encontrados nas diferentes espécies de mamíferos procedentes do LAPAS, CETAS-BH /GO coletados no período de agosto de 2015 a abril de 2017	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução geral.....	1
1.2 Hepatozoon spp.....	4
1.3 <i>Babesia</i> spp. e <i>Theileria</i> spp.....	8
1.4 Cytauxzoon sp.....	12
1.5 Diagnóstico.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Aspectos Éticos	19
4.2 Locais de Estudo	19
4.3. Animais do Estudo	20
4.4 Contenção física e química dos animais.....	21
4.5 Coleta de amostras de sangue total.....	23
4.6 Coleta de sangue periférico e preparo das extensões sanguíneas	25
4.7 Coleta e Identificação dos carrapatos.....	26
4.8 Técnica Molecular.....	27
4.8.1 Extração de DNA (ácido desoxirribonucleico)	27
4.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	27
4.8.3 Eletroforese	31
4.8.4 Purificação e sequenciamento	31
4.8.5 Análise dos Dados	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Resultados Gerais	32
5.2 Prevalência de Hepatozoon spp.....	34
5.2.1 Técnica de microscopia óptica	34
5.2.2 PCR	34
5.2.3 Espécies de Hepatozoon identificadas.....	35
5.3 Prevalência de Piroplasmas	36
5.3.1 Técnica de microscopia óptica	36
5.3.2 PCR	39
5.3.3 Espécies de piroplasmas identificadas.....	40
5.4 Infecções concomitantes.....	43
5.5 Positividade nos carrapatos	44
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ANEXO A - Termos de Concessão do Estudo.....	78
ANEXO B - Dosagens de anestésicos utilizados.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral

O território brasileiro, devido à grande extensão, clima e localização geográfica, possui ampla riqueza de biodiversidade, tanto de fauna quanto de flora (IBAMA, 2005). Paglia et al (2009) e Paglia et al (2012) estimam que o Brasil abriga entre 15 e 20% das espécies descritas no planeta, sendo a composição de mamíferos brasileiros correspondente à quase 13% da biodiversidade existente no mundo, com 701 espécies de mamíferos distribuídas em 243 gêneros, 50 famílias e 12 ordens.

Mamíferos brasileiros estão localizados em ambientes naturais e cativos como zoológicos, criadouros conservacionistas, científicos ou comerciais, institutos de pesquisa, centros de triagem e reabilitação e residências (criados ilegalmente, como animais de estimação) (MAIA, 2012).

O crescente aumento de mamíferos silvestres em ambientes cativos se deve, principalmente, à fragmentação de “habitats”, o que ocasiona em dificuldades na realocação destes animais aos ambientes naturais (MAIA, 2012; BARBOSA et al, 2014). O aumento destes animais em ambientes cativos tem exigido esforços para a manutenção de rigoroso manejo sanitário e, como forma de evitar a disseminação de agentes infecciosos, tenta-se reduzir o contato entre indivíduos de mesma espécie e entre espécies diferentes. Porém, apesar destes esforços, zoológicos, criadouros e outros centros que abrigam estes animais, continuam sendo propícios à disseminação de doenças (SILVA et al, 2001).

Outro fator importante e associado aos surtos de patógenos é o de origem antrópica, os quais aumentam o contato entre animais que vivem em habitats não alterados no convívio com outras espécies, que habitam regiões antropizadas adjacentes (DOBSON; FOUFOPOULOS, 2001). Esta proximidade entre as populações selvagens e os animais domésticos e humanos, tem facilitado a disseminação de agentes infecciosos que outrora

encontravam-se em equilíbrio com os reservatórios silvestres, em ambiente natural (CORRÊA; PASSOS, 2001).

A imunossupressão ocasionada pelo estresse no momento da captura, transporte dos animais, alteração da dieta e alterações climáticas podem também contribuir para surtos de doenças em mamíferos silvestres (BARBOSA et al, 2014). Todos estes fatores podem ocasionar consequências negativas na saúde de populações silvestres, que podem desenvolver graves quadros clínicos, culminando em óbito (EWING, et al., 1964; CHANG et al, 2000). Vale ressaltar que muitas espécies de mamíferos silvestres não apresentam sinais clínicos, quando doentes, ou não desenvolvem a doença, mesmo estando infectados, tornando-se fontes de infecção para animais domésticos, para o homem e para outros animais silvestres (ACHA; SZYFRES, 1986; CUBAS, 1996).

Estima-se que a fauna silvestre constitui um reservatório ainda desconhecido de bioagentes, muitos destes com potencial zoonótico (CHOMEL et al, 2007). Baseado nisso, vários são os agentes patogênicos que podem acometer mamíferos silvestres, estando entre elas os vírus, bactérias, protozoários e nematóides (THOYSI et al, 2000; JORGE et al, 2010; BARBOSA, 2014; OTRANTO et al., 2015; VAN VUUVREN et al, 2015).

Em relação aos protozoários, pode-se citar os hemoparasitos, que possuem artrópodes envolvidos para completar o ciclo biológico. Dentre os artrópodes, os carrapatos merecem destaque por estarem presentes tanto em ambientes urbanos como rurais e por serem os invertebrados mais numerosos que transmitem agentes infecciosos aos vertebrados domésticos e silvestres (CORRÊA; PASSOS, 2001; ALLAN, 2001; NAVA et al, 2009).

Estes invertebrados estão inseridos no filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari e agrupados na subordem Ixodida, que se subdivide em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae (HORAK et al, 2002; NAVA et al, 2009) e estão distribuídos em todos os continentes do mundo, inclusive na Antártida (LABRUNA, et al, 2005). No Brasil, a subordem Ixodida é que possui maior número de representantes, sendo 66 espécies (45

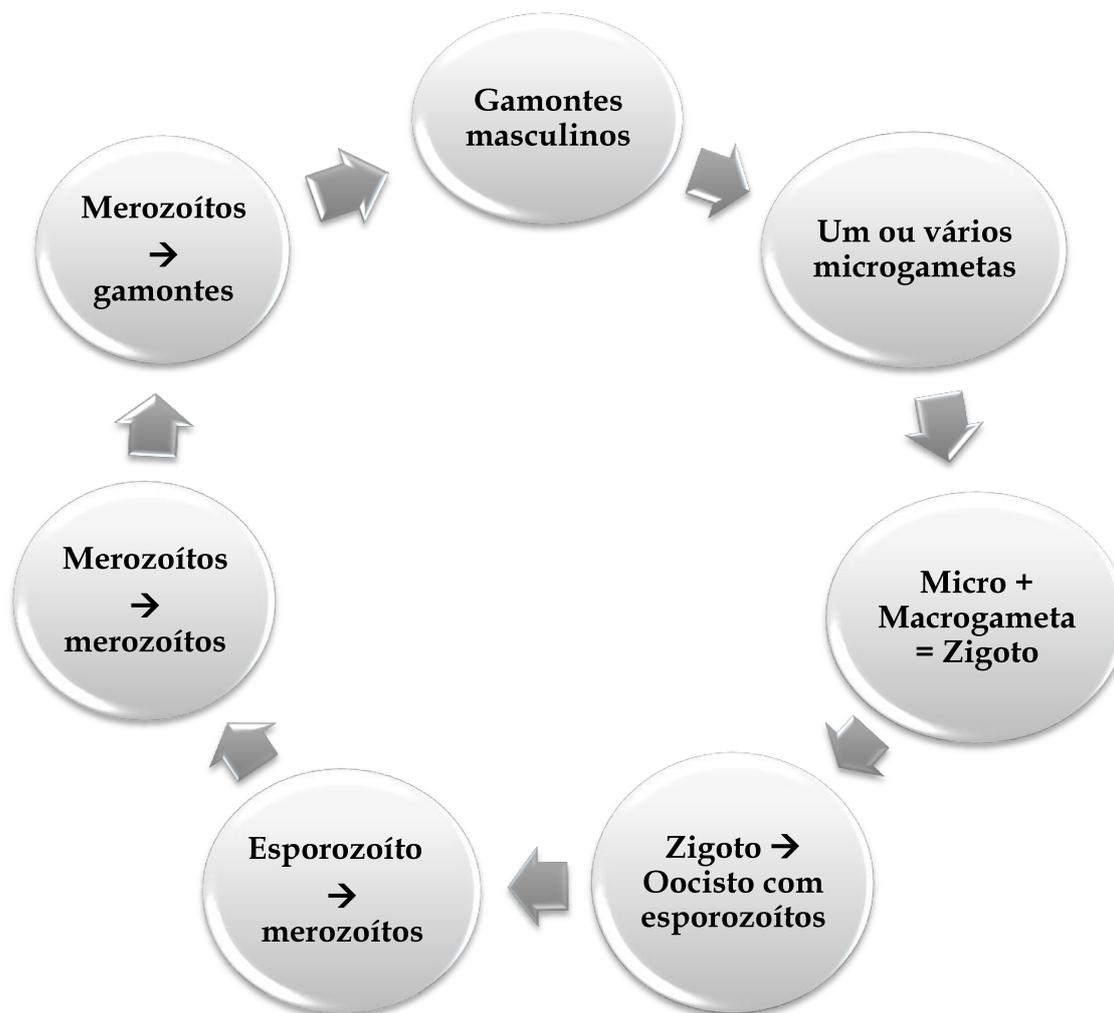
ixodídeos e 21 argasídeos) (MARTINS et al, 2014; NAVA et al, 2014).

Atualmente, várias doenças são transmitidas por carrapatos a vertebrados silvestres e domésticos (MAIA, 2012), as quais merecem destaque as causadas por protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa pois, alguns gêneros pertencentes a este filo possuem potencial zoonótico, e, por esta razão, têm se tornado crescente problema de saúde pública (ESTRADA-PENÃ et al, 2004; FOLVARI, 2005; PAROLA et al, 2005).

A primeira caracterização deste filo seguiu a revisão de Levine et al (1980), que o subdividiu em quatro grupos principais: as gregarinas, os coccídios, os hemosporídios e os piroplasmas. Esta caracterização ainda se mantém, sendo as subclasses Haemosporida e Piroplasmorida inseridas na classe Aconoidasida e as subclasses Gregarinasina e Coccidiasina inseridas na classe Conoidasida. É importante destacar a localização de alguns parasitos de importância médica e médico-veterinária inseridas na classe Coccidiasina, como os pertencentes à ordem Adeleorina que incluem os parasitos do gênero *Hepatozoon* e a classe Piroplasmorida que possui uma única ordem Piroplasmida em que estão inseridos os gêneros *Cytauxzoon*, *Theileria* e *Babesia*, os quais acometem mamíferos domésticos e silvestres, sendo o último gênero, de potencial zoonótico (ADL et al, 2005; BARTA et al, 2012).

Os parasitos pertencentes a esse Filo possuem ciclo de vida complexo, podendo apresentar duas fases: assexuada (merogonia e esporogonia) e sexuada, conhecida como gametogonia. (SIDALL, 1995), em que, no vetor, o gametócito masculino diferencia-se em um ou mais microgametas, fertiliza, originando o zigoto (gametogênese). Este se diferencia em oocistos contendo esporozoítos (esporogênese). No hospedeiro vertebrado, os esporozoítos invadem células, diferenciam-se em merozoítos e dividem-se em até duas vezes assexuadamente (merogonia primária e merogonia secundária), gerando várias células filhas, chamadas de merozoítos. Em seguida, diferencia-se em gametócitos (gametogonia), que são precursores da fase sexual (SIDALL, 1995). As etapas do desenvolvimento sexual do ciclo de parasitos apicomplexos estão esquematizados na Figura 1.

FIGURA 1: Esquema geral das fases reprodutivas de parasitos pertencentes ao Filo Apicomplexa



Fonte: Siddall, (1995).

Em síntese, hemoparasitos representam agentes que se destacam pela importância médica e médico-veterinária e são cada vez mais valorizados no contexto da conservação da biodiversidade de animais selvagens (DASZAK et al, 2000; CRIADO-FORNÉLIO et al, 2009).

1.2 *Hepatozoon* spp.

O gênero *Hepatozoon*, descrito pela primeira vez por Miller em 1908, é um grupo diverso de parasitos apicomplexos da família Hepatozoidae, com 312 espécies descritas por Smith, (1996) e, desde então, mais espécies estão sendo adicionadas ou reclassificadas (KUBO et al, 2008; TELFORD, 2010). O acometimento por parasitos deste gênero, leva ao

desenvolvimento da doença denominada hepatozoonose (BANETH, 2011; AKTAS et al, 2015).

Os hospedeiros definitivos desses patógenos incluem carrapatos, acaríneos, flebotomíneos, moscas tsé-tsé, culicídeos, pulgas, piolhos, reduvídeos e sanguessugas (BANETH et al, 2007). A infecção tem sido reportada em inúmeros vertebrados (anfíbios, répteis, aves) e 39 espécies de *Hepatozoon*, infestando mamíferos domésticos e silvestres (SMITH, 1996).

Dentre as espécies descritas em mamíferos, *Hepatozoon canis*, *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon felis* são mais conhecidos e infectam, frequentemente, canídeos e felídeos domésticos e silvestres (CHRISTOPHERS, 1907; VINCENT-JOHNSON et al, 1997). O *Hepatozoon felis* é pouco estudado em relação à patogênese, porém, é provável que essa espécie acometa felinos domésticos e silvestres, globalmente (BANETH et al, 2013).

Diferentemente de outros agentes transmitidos por carrapatos, a propagação de protozoários deste gênero ocorre, tipicamente, pela ingestão do vetor artrópode, infectado por oocistos maduros contendo esporozoítos infectantes (CHRISTOPHERS, 1907; BANETH et al, 2007). São relatadas outras formas de transmissão, como a transmissão vertical para *H. canis* (MURATA et al, 1993; IVANOV et al, 2008), transmissão trófica (ingestão de cistozoítos infectantes presentes em tecidos de presas, como serpentes, lagartos e anuros) (SMITH, 1996; SLOBODA et al, 2008; JOHNSON et al., 2009; MAIA et al, 2014) e a ingestão de vetores infectados agarrados à presa (EWING; PANCIERA, 2003).

A transmissão de *Hepatozoon* sp., envolve etapas comuns aos protozoários do filo Apicomplexa. É importante mencionar que, em hospedeiros vertebrados, após a ingestão de oocistos presentes na hemocele de carrapatos, estes penetram a parede do intestino, caem na circulação e invadem monócitos e/ou neutrófilos de inúmeros órgãos (medula óssea, baço, fígado, rins, pulmões, intestino, linfonodos e tecidos musculares esqueléticos). Nestas células teciduais, ocorre a primeira merogonia, sendo identificados entre 20-30 micromerozoítos e

entre 1-4 macromerozoítos nas células. Os micromerozoítos evadem da célula hospedeira e invadem novas células para desenvolvimento em gamontes (gamontogonia). Os macromerozoítos evadem da célula e infectam outros leucócitos, formando micro ou macromerozoítos novamente (segunda merogonia) (BANETH et al, 2007).

As espécies *H. canis* e *H. americanum*, possuem diferenças em relação à distribuição, virulência, tropismo por células e órgãos, assim como espécies de vetores, patogenia e sinais clínicos (CRAIG et al, 1978; MACINTIRE et al, 2001; POTTER; MACINTIRE, 2010).

O *H. canis*, que possui distribuição cosmopolita (AKTAS et al, 2015), é a espécie menos virulenta, com tropismo por neutrófilos e acomete diversos órgãos como fígado, baço, pulmões, rins e medula óssea do hospedeiro vertebrado (BANETH, 2011). A infecção por esta espécie, pode ocorrer de forma assintomática com quadros clínicos brandos à severos, os quais dependem da parasitemia (SAKUMA et al, 2009). Os principais sintomas são aumento da temperatura corporal, letargia, perda de peso, anemia e as formas mais graves podem apresentar hepatite, pneumonia e glomerulonefrite (BANETH; WEIGLER, 1997).

O vetor responsável pela transmissão é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (CRISTOPHERS, 1907; BANETH et al, 2007; GABRIELLI et al, 2010), entretanto, existe a possibilidade que outras espécies, tais como, *Haemaphysalis longicornis* e *H. flava*, no Japão e *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga* e *Dermacentor reticulatus* na Europa, possam estar envolvidas (MURATA, 1995; GABRIELLI et al, 2010; REYE et al, 2010; NAJM et al, 2014). No Brasil, estudos têm sugerido outras espécies de carrapatos como potenciais vetores de *H. canis*, tais como *Amblyomma ovale*, *A. sculptum* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (O'DWYER et al, 2001; FORLANO et al, 2005; MIRANDA et al, 2011).

O *H. americanum* é considerado mais virulento do que *H. canis*, sendo, a infecção, geralmente, letal (CRAIG et al, 1978; MACINTIRE et al, 2001). Possui tropismo por monócitos presentes em músculos estriados esqueléticos e cardíacos (PANCIERA et al, 2000; BANETH et al, 2003). As alterações patológicas incluem inflamações, infiltrados celulares,

alterações vasculares e dano tecidual, devido aos anticorpos e pela deposição de imunocomplexos (EWING; PANCIERA, 2003; MACINTIRE et al, 2006). O *Amblyomma americanum* não ocorre no Brasil é a única espécie de carrapato envolvida na transmissão em países da América do Norte (MATHEW et al, 1998; EWING; PANCIERA, 2003).

Estudos sobre *Hepatozoon* em mamíferos silvestres, principalmente em carnívoros, têm sido realizados na Europa. Levantamentos epidemiológicos envolvendo raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), consideradas reservatórios de *Hepatozoon*, foram realizados em Portugal e na Áustria, com prevalências de 48% a 58%, respectivamente (CONCEIÇÃO-SILVA et al, 1988; DUSCHER et al, 2013, 2014; FARKAS et al., 2014; MITKOVÁ et al, 2014, 2016).

O parasito também foi observado em carnívoros, como no cão-selvagem-africano (*Lycaon pictus*), guaxinim-norte-americano (*Procyon lotor*), marsupiais como o gambá-da-virgínia (*Didelphis virginiana*) e em diferentes espécies de pequenos roedores, com prevalências variadas de 58% e 40%, na América do Norte e África, respectivamente (SHKAP et al, 1994; JOHNSON et al, 2007; SALAKIJ et al, 2008; ALLEN et al, 2011; MAIA et al, 2014).

No Brasil, o parasito foi observado em canídeos silvestres como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), graxaim-do-campo (*Pseudalopex gymnocercus*) com prevalências variadas (CRIADO-FORNÉLIO et al, 2006; ANDRÉ et al, 2010; ALMEIDA et al, 2013; SOUZA et al, 2017) sendo que, as maiores taxas de prevalência registradas são em cachorro-do-mato (*C. thous*) de 43,1% no Espírito Santo, 55% no Rio Grande do Sul e 91% na Amazônia (CRIADO-FORNÉLIO et al, 2006; ALMEIDA et al, 2013; SOUZA et al, 2017) e haplótipos próximos similares a *Hepatozoon americanum* foram encontrados em todos estes estudos. Apesar de o *H. americanum*, geralmente, induzir infecção agressiva, neste canídeo, a espécie aparentemente não causa sintomas da infecção (SOUZA et al, 2017).

Em felídeos silvestres, o *Hepatozoon* foi relatado por métodos moleculares em

Leopardus pardalis (jaguatirica), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato), *Puma yagouaroundi* (gato jaguarundi) e *Panthera onca* (onça-pintada) (METZGER et al, 2008; WIDMER et al, 2009; ANDRÉ et al, 2010; SOUZA et al, 2017; SOARES et al, 2017; FURTADO et al, 2017) em que a maioria destes animais estava infectada com genótipo similar ao de *H. felis* (METZGER et al, 2008; WIDMER et al, 2009; FURTADO et al, 2017; SOARES et al, 2017).

Além destas, outras espécies de *Hepatozoon* foram identificadas em mamíferos silvestres no Brasil como em carnívoros *Nasua nasua* (quati) e *Procyon cancrivorus* (mão-pelada), pequenos roedores e marsupiais de espécies *Thylamus macrucus* (cuíca), *Monodelphis domestica* (cuíca-de-rabo-curto) e *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) (RODRIGUES et al, 2007; CRIADO-FORNÉLIO et al, 2006; CRIADO-FORNÉLIO et al, 2009; DEMONER et al, 2016; WOLF et al, 2016; SOUZA et al, 2017; SILVA et al, 2017).

1.3 Babesia spp. e Theileria spp.

Os gêneros *Babesia* e *Theileria*, pertencentes às famílias Babesiidae e Theileriidae, respectivamente, são piroplasmas intraeritrocíticos (HOMER et al, 2000; UILENBERG, 2006), com distribuição cosmopolita, encontrados, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (COLLET, 2000; KIVARIA et al, 2007). São agentes etiológicos da babesiose e theileriose, doenças transmitidas por carrapatos da família Ixodidae. Essas doenças acometem mamíferos domésticos, silvestres, incluindo o homem (UILENBERG, 1995; HOMER et al, 2000; ALMOSNY, 2002; BISHOP et al, 2004; INCI et al, 2009; YABSLEY et al, 2013).

Várias são as espécies de *Babesia* descritas em mamíferos silvestres, principalmente, em carnívoros e ungulados (PENZHORN, 2006), tais como *B. felis*, *B. herpailuri*, *B. leo* e *B. pantherae* em felinos (DAVIS, 1929; DENNIG; BROCKSLESBY, 1972; PENZHORN et al, 2001), *B. capreoli*, *B. odocoilei* e *B. pattoni* de cervídeos (DISSANAIKE, 1963; EMERSON; WRIGHT, 1970). Além destas, há a ocorrência de *Babesia* sp. semelhantes às comumente

encontradas em animais domésticos, como *B. gibsoni*, *B. rossi* de canídeos domésticos, em canídeos silvestres (MATJILA et al, 2008; CARDOSO et al, 2013), *B. trautmanni* de porcos domésticos, em javalis, *B. caballi* de equinos domésticos, em várias espécies de zebra (PENZHORN, 2006) e *B. bovis* e *B. bigemina*, de grandes ruminantes domésticos, em cervídeos silvestres (HOLMAN et al, 1993; HOLMAN et al, 2011).

Em relação à *Theileria*, destaca-se a importância das espécies *T. parva* e *T. anullata*, pela associação com doenças linfoproliferativas em ruminantes domésticos (BISHOP et al., 2004), sendo o hospedeiro original de *T. parva*, um ruminante silvestre, o búfalo-africano (*Syncerus caffer*), no qual o parasito não causa danos ao hospedeiro.

Outras espécies, como *Theileria cervi* ocorrem em cervídeos dos Estados Unidos e do Brasil, causando infecção assintomática nestes hospedeiros (KOCAN; KOCAN, 1991; SILVEIRA et al, 2011; SILVEIRA et al, 2013).

Além destas, outras *Theileria* sp., comumente encontradas em mamíferos domésticos, são relatadas em mamíferos silvestres, como *Theileria annae*, comum de cães domésticos, mas é frequentemente encontrada em raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Europa e *Theileria capreoli*, espécie comum de cervídeos. Ademais, foi relatada em canídeos silvestres, lobo (*Canis lupus*), na Croácia (CARDOSO et al, 2013; ZANET et al, 2014; FARKAS et al, 2015; BECK et al, 2017).

O gênero *Babesia* pode ser dividido, morfológicamente, em dois grupos, a saber: pequenas e grandes babesias. São pequenas babesias, as que medem de 1- 2,5 μm , sendo *B. bovis*, *B. gibsoni*, *B. microti* e *B. rodhaini*, alguns exemplos. As grandes babesias, possuem de 2,5– 5,0 μm de comprimento, como as espécies *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. canis*, dentre outras (HOMER et al, 2000; YABLSEY et al, 2013; LAHA et al, 2015).

Os gêneros possuem plasticidade morfológica, apresentando formas variáveis dentro das células preferenciais. As babesias possuem formato piriforme, podendo ser encontradas em forma única, dímera ou em cruz. *Theileria* possui formatos oval, anular, circular, ovóide

ou irregular (LAHA et al., 2015; LEMPEREUR et al., 2017). Devido às diversas formas e o mesmo modo de transmissão, podem ser confundidas, porém são parasitos distintos, com diferenças no que tange ao parasitismo e à biologia (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

A intensa multiplicação de *Babesia* ocorre apenas nos eritrócitos, nos quais os esporozoítos inoculados pelo vetor multiplicam-se intensamente para formarem merozoítos (merogonia). Os merozoítos formados invadem novos eritrócitos, ocorre nova merogonia e este ciclo se repete até a morte do hospedeiro ou até que o sistema imune do hospedeiro paralise a intensa multiplicação do parasito (UILENBERG, 2006). Para *Theileria* spp., os esporozoítos penetram rapidamente nos linfócitos ou nas células do sistema mononuclear fagocítico (SMF). Nestas células ocorre a formação de esquizontes, que, quando maduros, apresentam numerosos merozoítos, os quais evadem dos linfócitos e invadem eritrócitos do hospedeiro para ocorrência de merogonia nestas células (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; UILENBERG, 2006).

A principal transmissão, para ambos os gêneros, é vetorial, pela picada do carrapato, porém, o desenvolvimento dentro do vetor se difere entre eles. Tanto para *Babesia*, como para *Theileria*, o vetor ingere eritrócitos contendo piroplasmas e o desenvolvimento sexual dos parasitos, em macro e microgametócitos, ocorre no intestino do vetor, com posterior formação de zigotos móveis ou cinetos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Para *Theileira*, os cinetos penetram nas células das glândulas salivares, local em que se desenvolvem em esporozoítos infectantes. As glândulas salivares se expandem e os cinetos modificam-se, dividem-se sucessivamente e formam os esporozoítos, que é relativo ao modo infectante para o hospedeiro intermediário (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; UILENBERG, 2006). Em relação à *Babesia* spp., os cinetos multiplicam-se, sendo denominados vermículos, os quais invadirão vários órgãos do carrapato que, além das glândulas salivares, atingem os ovários. A fêmea passa, dessa forma, o parasito para as gerações subsequentes. Assim como ocorre em *Theileria*, a maturação de esporozoítos infectantes acontece nas glândulas salivares do vetor

(UILENBERG, 2006).

Várias são as espécies de *Babesia* e *Theileria* que têm sido encontradas em animais silvestres. São exemplos, *Babesia rossi*, que, na África, causa de doença severa à fatal em cães domésticos, possuindo taxas de 5,3% a 84,6% de ocorrência em cão-selvagem-africano (*Lycaon pictus*) e chacal-de-dorsonegro (*Canis mesomelas*), respectivamente (JACOBSON, 2006; MATJILA et al, 2008; PENZHORN et al, 2017); *Theileria annae*, que, em raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), apresenta taxas variando entre 5,2% a 69,2% na Croácia e em Portugal, respectivamente (DEZDEK et al., 2010; CARDOSO et al, 2013); *Theileria capreoli*, espécie comum em cervídeos, identificada em 68% dos lobos (*Canis lupus*), na Croácia (BECK et al., 2017) e *B. bovis*, patógeno comum de bovinos domésticos, foi identificado em 12,5% de veados-vermelhos (*Cervus elaphus*) na Itália (TAMPIERI et al, 2008).

No Brasil, *Babesia* e *Theileria* foram relatados em cervídeos, sendo a prevalência de *T. cervi*, no país, variando entre 47% a 52% em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), em Minas Gerais e no Pantanal (SILVEIRA et al, 2011; SILVEIRA et al, 2013). Outros estudos verificaram taxas de ocorrência de *B. bovis* variando de 8,3% a 88,2% e de *B. bigemina* entre 9,2% a 29,7% em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*) de Goiás e do Paraná (MACHADO; MULLER, 1996; DUARTE, 2007).

Estas taxas de ocorrência são indicativos que, na presença de vetores, *Babesia* sp. e *Theileria* sp. podem ser deslocadas de animais de produção, para animais silvestres do entorno e vice-versa. Nas espécies silvestres, normalmente, não há sinais clínicos, podendo ser reservatórios destes patógenos, responsáveis por surtos e emergência de doenças para espécies susceptíveis (PENZHORN et al., 2006; SILVEIRA et al., 2011). Entretanto, em animais mantidos em cativeiro, a infecção por *Babesia* spp. pode ser fatal, devido a fatores como estresse de captura, e manutenção em cativeiro (PENZHORN, 2006).

Algumas babesias e theilerias desencadeiam infecção benigna em animais silvestres,

sendo, a sintomatologia observada nestes animais, decorrentes de situações específicas como estresse, imunossupressão, infecção com outras doenças ou desnutrição e, devido à fase de esquizogonia intralinfocítica, que em infecções por theileria, ocasionam danos que podem ser fatais ao hospedeiro (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; KOCAN; KOCAN, 1991; FOWLER, 1993; JANG et al, 2003; YABSLEY et al, 2005; KHUKHUU et al, 2010). O quadro clínico, nestes animais, inclui linfadenopatia, febre, anorexia, anemia, icterícia, perda de peso e, eventualmente, morte, se não tratada em animais susceptíveis (BELOTINDOS et al, 2014).

1.4 *Cytauxzoon* sp.

A cytauxzoonose é uma doença causada por parasitos do gênero *Cytauxzoon*, pertencentes à família *Theileriidae*, (HOMER et al, 2000; MEINKOTH; KOCAN, 2005) e a principal espécie do gênero é o *Cytauxzoon felis*, descoberta pela primeira vez, como agente causador de doença fatal em gatos domésticos nos Estados Unidos. Esta espécie também ocorre em felinos silvestres e possui distribuição nas Américas, mas com alguns estudos relatando ocorrência na Europa (WAGNER, 1975; WAGNER, 1976; KIER, 1979; VERONESI et al, 2016; FURTADO et al, 2017).

Os vetores do gênero *Cytauxzoon* são, principalmente, os carrapatos ixodídeos (PEIXOTO et al, 2007). Nos Estados Unidos foi comprovada a transmissão de *C. felis* por *Dermacentor variabilis* (Blouin et al, 1984) e *Amblyomma americanum* (REICHARD et al, 2010). No Brasil, o vetor de *Cytauxzoon* sp. permanece desconhecido (PEIXOTO et al, 2007).

Os hospedeiros vertebrados da espécie *C. felis* são gatos domésticos (HOLMAN; SNOWDEN, 2009) e felinos silvestres, como o lince-pardo (*Lynx rufus*), mamífero silvestre endêmico nos Estados Unidos, o qual é considerado hospedeiro natural deste parasito (GLENN et al, 1983; BLOUIN et al, 1984; MILLÁN et al, 2007). Outras espécies são relatadas para *C. felis*, como pantera-da-Flórida (*Puma concolor coryi*), de vida livre e onça-do-Texas (*Puma concolor stanleyana*) (ROTSTEIN et al, 1999).

A morfologia de *C. felis* dentro de eritrócitos é muito semelhante à de pequenas babesias e *Theileria* spp., sendo encontrados formatos individuais anelares, ovais ou circulares, com diâmetro de 0.5–0.8µm (CARLI et al, 2012).

Desconhece-se informações sobre o ciclo completo de *Cytauxzoon* sp., vetores, bem como o ciclo no vetor, e no hospedeiro vertebrado, bem como as formas de transmissão (MILLÁN et al, 2007; CARLI et al, 2012). Entretanto, sabe-se que o ciclo no hospedeiro vertebrado possui fase inicial de esquizogonia em células do SMF, causando oclusão destas células em vasos sanguíneos e a resposta inflamatória ocasionada é sistêmica e profunda. As células mononucleares tornam-se maiores com a presença dos esquizontes, que liberam merozoítos, os quais atingem a circulação sanguínea e infectam eritrócitos, nos quais são chamados piroplasmas (NIETFELD; POLLOCK, 2002; MILLÁN et al, 2007). O desenvolvimento de formas esquizogônicas é responsável pela severidade e fatalidade da doença (NIETFELD; POLLOCK, 2002).

Cytauxzoon felis possui prevalência em felinos silvestres variada, sendo 57% em suricatos (*Suricata suricatta*) no sul da África, 25,6% em lince-pardo (*Lynx rufus*) nos Estados Unidos e 14,3% em gatos-europeus (*Felis silvestris silvestris*) na Itália (BROWN et al, 2010; LECLAIRE et al, 2014; VERONESI et al, 2016).

No Brasil, o *Cytauxzoon* sp. foi identificado em leões (*Panthera leo*) com sintomatologia severa da doença e formas esquizogônicas em macrófagos, de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento foram observados (PEIXOTO et al, 2007). Por estudos moleculares, o *C. felis* foi identificada em felinos silvestres assintomáticos de vida livre e cativo, como jaguatirica (*Leopardus pardalis*), onça-parda (*Puma concolor*) e onça-pintada (*Panthera onca*) e no estudo conduzido com onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre, observou-se taxa de 96,7% dos animais infectados com *C. felis* (ANDRÉ et al, 2009; FURTADO et al, 2017).

Pesquisadores brasileiros têm observado que a alta prevalência de *Cytauxzoon felis*

entre felídeos de vida livre e cativeiro pode indicar que felídeos silvestres do país podem atuar como reservatórios deste patógeno. Assim, o risco de cytauxzoonose tornar-se uma doença emergente, encontra-se na translocação e reintrodução de felinos silvestres acometidos por *Cytauxzoon*, para regiões em que há provável contato com vetores e felinos domésticos (MILLÁN et al, 2007).

Estudos que investigaram a ocorrência de *C. felis* em felinos domésticos no Brasil, observaram a maioria dos felinos negativos para este patógeno. A observação comum dos estudos é que *C. felis*, que ocorre no Brasil, circula mais entre os felídeos silvestres do que domésticos (ANDRÉ et al, 2014; 2015; FURTADO et al, 2017).

A cytauxzoonose aguda e sintomática, que normalmente ocorre em gatos domésticos, principalmente da América do Norte, apresenta um curso clínico severo, rápido e fatal, em que a maioria dos animais morre dentro de uma semana desde o início da infecção, apresentando como sintomas, febre, letargia, anorexia, desidratação, icterícia e dispneia e esplenomegalia. Entretanto, estes sintomas não são manifestados quando a infecção ocorre em felinos silvestres brasileiros (HOOVER et al, 1994; GREENE et al, 2006; HOLMAN; SNOWDEN, 2009).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de parasitos dos gêneros *Hepatozoon* e agentes Piroplasmida (*Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*) pode ser feito, principalmente, pela visualização de formas evolutivas destes parasitos, coradas em extensões sanguíneas, confeccionados a partir de sangue periférico dos vertebrados, coradas com Giemsa em diluição proporcional. Outros corantes como Romanowsky, Diff-Quik e Wright também são utilizados (LEMPEREUR et al, 2017).

Esta técnica possui vantagens relacionadas ao custo e à facilidade de execução, porém é considerada subjetiva, dependendo da experiência do observador e do tempo gasto na análise

da lâmina, sendo técnica inespecífica e de baixa sensibilidade (HOLMAN; SNOWDEN, 2009).

Poucas são as características morfológicas utilizadas para distinguir piroplasmas em extensões sanguíneas, como o tamanho e a forma, sendo que, para a maioria das espécies, a análise morfológica é indistinguível e pode resultar em diagnósticos confusos, visto que a morfologia de *Cytauxzoon* sp. é semelhante à de *Theileria* sp., pequenas *Babesia* sp. e *Mycoplasma haemofelis*. Além disso, a morfologia de piroplasmas pode variar em hospedeiros incomuns, como animais silvestres, tornando este diagnóstico falho, se utilizado sozinho para definir a identidade de espécies de hemoparasitos (HOMER et al, 2000).

Em casos de alta parasitemia de hemoparasitos (casos agudos de piroplasmose e hepatozoonose), a visualização das formas evolutivas em extensões sanguíneas é suficiente para estabelecer o diagnóstico apropriado (HOMER et al, 2000; YABSLEY et al, 2013). Porém, havendo a necessidade de discriminar as sutilezas morfológicas, principalmente, entre os piroplasmas, somadas às parasitemias variáveis nos hospedeiros, o resultado desta técnica é pouco fidedigno, pois nem sempre formas evolutivas circulantes são detectáveis (O'DWYER et al, 2001).

Testes sorológicos são utilizados no diagnóstico de infecções quando antígenos homólogos ou de uma variedade de espécies, proximamente relacionadas estão disponíveis para aplicação da técnica. Como inúmeros casos de hemoparasitos não manifestam sintomas nos hospedeiros, casos crônicos da doença são mais propensos a serem diagnosticados pela sorologia. Apesar desta vantagem, este diagnóstico não permite a identificação de espécies, pois novas espécies de piroplasmas e *Hepatozoon* podem ocasionar infecções cruzadas com antígenos de espécies utilizados nos testes (SHKAP et al, 1994; BANETH et al, 1996; YABSLEY et al, 2013).

Técnicas histológicas de órgãos em que ocorre esquizogonia dos hemoparasitos (baço, fígado ou rins), podem ser benéficas se aplicadas precocemente (HOLMAN; SNOWDEN,

2009) e, quando aliadas à análise molecular, torna-se possível a identificação mais específica de piroplasmas e parasitos do gênero *Hepatozoon* (O'DWYER et al, 2004; CARLI et al, 2012).

Entretanto, nos últimos anos, o advento da análise molecular e filogenética tem revolucionado completamente a sistemática nas últimas décadas e tem resultado na reclassificação de muitos organismos (OOSTHUIZEN et al., 2009) pois, trata-se de técnica mais sensível que a microscopia (WANG et al, 2015). Neste sentido, muitos protocolos de PCR convencional e “*real-time*” têm sido descritos para a detecção de hemoparasitos em hospedeiros vertebrados e vetores (LEMPEREUR et al, 2017).

Os alvos de análises moleculares de piroplasmas e *Hepatozoon* incluem o gene 18S rRNA, citocromo B (mt-cyt B), 16S rRNA, gene EMA-1 “*Erythrocyte merozoite antigen- 1*”, espaçador de transcrição interna 1 (ITS1), dentre outros, sendo o gene 18S o mais utilizado devido à natureza conservada e ao arranjo repetitivo dentro do genoma, que fornece grandes quantidades de moldes de DNA para PCR. Porém, é recomendado que ocorra a amplificação do gene 18S rRNA completo ou quase completo, particularmente quando é diagnóstico para novos organismos, garantindo que variações genéticas não interfiram no resultado (HUNFELD et al, 2008; OOSTHUIZEN et al, 2008; BHOORA et al, 2009; LEMPEREUR et al, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, trabalhos sobre doenças em mamíferos silvestres foram negligenciados em pesquisas científicas. Entretanto, a procura por hemoparasitos nesses animais vêm aumentando à medida que surgem preocupações acerca da conservação de espécies. Isso tem ocorrido, pois muitos destes mamíferos se enquadram em categorias de risco de extinção ou preocupação e, questões não esclarecidas sobre espécies/subgrupos/genótipos de hemoparasitos, vetores, distribuição, patogenia, dentre outros, estão apenas começando a ser descobertos.

Animais silvestres, devido à perda do “habitat” causado por ações antrópicas, têm sido cada vez mais encontrados em ambientes urbanos e periurbanos, por órgãos ambientais como o IBAMA e destinados aos centros próprios de alojamento e manutenção temporária de espécies silvestres. Nestes centros, sinais clínicos inaparentes de infecções por hemoparasitoses podem ocorrer. Conhecer o mecanismo de transmissão e manutenção destes parasitos, nestes animais assintomáticos, os quais podem atuar como reservatório de muitos patógenos para outros animais, é importante. Apesar disso, os estudos são escassos, desconhecendo-se a diversidade de patógenos, estando entre eles os hemoparasitos e fatores epidemiológicos associados.

Baseado nisso, faz-se necessária a investigação de principais hemoparasitos que infectam animais silvestres que são destinados aos centros de recepção e reabilitação. Além disso, torna-se importante conhecer os vetores dessas parasitoses. Essas informações são importantes para o entendimento da epidemiologia das doenças, assim como para implementar intervenções médicas e sanitárias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

O objetivo geral desse trabalho é determinar a ocorrência de *Hepatozoon* spp. e piroplasmas (Apicomplexa: Piroplasmida) em mamíferos silvestres de centros de recepção e reabilitação de animais silvestres.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Determinar a ocorrência de *Hepatozoon* spp. e piroplasmas, pela microscopia óptica convencional (extensão sanguínea);
- b) Determinar a ocorrência de *Hepatozoon* spp. e piroplasmas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- c) Identificar, pela PCR e pelo sequenciamento, espécies de *Hepatozoon* e piroplasmas presentes nos mamíferos silvestres do estudo;
- d) Identificar os gêneros e/ou espécies de carrapatos presentes nos mamíferos envolvidos no estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais, da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), Uberlândia, MG, Brasil, sob protocolo de número 036/16, pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), licença número 52561-2, pela Secretaria de Meio Ambiente do Instituto Estadual de Florestas (IEF) com licença de número 017/2016 e pela Secretaria do IBAMA de Goiânia com licença de número 02010.001015/2016-77.

As coletas de amostras dos animais mantidos e destinados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa de Animais Silvestres (LAPAS), vinculado à UFU foram autorizadas pelo Prof. Dr. André Quagliatto Santos, diretor responsável.

Todas as licenças descritas anteriormente foram incluídas no Anexo A.

4.2 Locais de Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), vinculado à UFU, em Uberlândia - Minas Gerais, no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-IBAMA) de Goiânia - Goiás e no CETAS-IBAMA de Belo Horizonte - Minas Gerais.

O LAPAS possui recintos individuais e coletivos para manutenção dos animais e conta com equipe especializada de Médicos Veterinários e de Biólogos, além de graduandos de diferentes cursos (Veterinária e Ciências Biológicas), os quais são responsáveis pelo atendimento de animais com problemas de saúde trazidos por proprietários ou apreendidos/resgatados pelo IBAMA e pela Polícia Militar Ambiental (PMA).

Os animais quando chegam ao LAPAS, são encaminhados ao ambulatório local, para exames clínicos e, posteriormente, em caso de necessidade, recebem tratamento,

permanecendo em observação até a sua total recuperação. Indivíduos saudáveis apreendidos e/ou resgatados são mantidos no LAPAS até o retorno dos representantes do IBAMA, os quais autorizam a soltura destes em áreas determinadas, em geral, inseridos nos limites municipais da cidade de Uberlândia.

Os CETAS são unidades do IBAMA criadas na década de 70 pelo Governo Federal, havendo 24 unidades em funcionamento em 21 capitais do Brasil. Esses centros de Triagem têm por objetivo atender os animais desde a recepção até a destinação final. O órgão trabalha em conjunto com outros programas governamentais, tais como os Centros de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), sendo locais de recuperação de animais, o que não permite a visitação de pessoas.

No momento em que os animais chegam aos Centros de Triagem ou de Reabilitação, são identificados de acordo com a espécie e número de registro, por biólogos e submetidos a exames clínicos por médicos veterinários do local. Posteriormente, os mesmos são acompanhados por uma equipe de profissionais (médicos veterinários, biólogos e tratadores) que são responsáveis pelo manejo, tratamento médico diário e elaboração da alimentação, administração de medicação adequada e, em alguns casos, intervenções cirúrgicas.

Quando os animais se tornam aptos a retornarem ao ambiente natural, estes são inseridos em programas de soltura, vinculados a programas específicos de manejo para diferentes espécies.

4.3. Animais do Estudo

A população animal inserida neste estudo compreendeu todos os mamíferos presentes nos locais supracitados no momento da coleta do material biológico.

O número mínimo de animais do estudo foi definido com base em trabalhos conduzidos no Brasil, os quais tinham como objetivo avaliar hemoparasitoses em mamíferos silvestres tais como os de André et al, (2009, 2010, 2011).

Para o estudo, foram colhidas amostras sanguíneas de todos os mamíferos que se encontravam nos centros, independente da ordem, família, sexo, faixa etária, procedência e tempo de estadia no local.

Foram considerados animais cativos aqueles que estavam nos CETAS/LAPAS por mais de três ou quatro meses, assim como aqueles que além do tempo, não seriam, por vários motivos, reintegrados ao habitat de origem. Os animais considerados de vida livre foram todos os que eram submetidos à coleta de amostras no momento em que chegavam aos CETAS/LAPAS.

4.4 Contenção física e química dos animais

Os procedimentos de contenção e manipulação dos animais seguiram rigorosamente as técnicas semiológicas em Medicina Veterinária para mamíferos silvestres e recomendações estabelecidas pelo Tratado de Animais Selvagens (Cubas et al., 2006) e pela Sociedade Americana de Mastozoologia para uso de mamíferos selvagens em pesquisas científicas (SIKES; GANNON, 2011).

Para a obtenção das amostras sanguíneas, os animais foram contidos, utilizando métodos físicos e/ou químicos. A contenção física foi realizada pelos médicos veterinários, com o auxílio de equipamentos como luvas de raspa de couro, puçás, cambão, cordas, focinheiras e redes (CUBAS et al, 2006), ilustrados na Figura 2.

FIGURA 2: Equipamentos de contenção física utilizados nos mamíferos silvestres do estudo¹

Fonte: Próprio autor (2016)

A contenção química foi realizada também por médicos veterinários, que utilizaram tranquilizantes à base de Cloridrato de Xilazina (Virbac, França), Quetamina (Virbac, França), Cloridrato de Titelamina-Zolazepam (Virbac, São Paulo, Brasil) e Isoflurano (Cristália, Minas Gerais, Brasil). Os cálculos das dosagens anestésicas foram baseados nos protocolos de Viana, (2003) e Carpenter, (2010) e estão presentes no Anexo B. Além da espécie, foram respeitadas características como idade, escore da condição corporal, peso, espécie e estado de saúde de cada animal. A Figura 3 ilustra o momento de administração de anestésicos em alguns animais do estudo.

¹ (A) e (B) - Luvas de raspa de couro para contenção de raposa-do-campo e sagui. (C) - Corda utilizada para conter o lobo-guará, previamente anestesiado. (D) - Focinheira utilizada para conter a onça-parda, previamente anestesiado.

FIGURA 3: Momento de utilização de anestésico nos mamíferos do estudo²

Fonte: Próprio autor (2016)

4.5 Coleta de amostras de sangue total

As amostras sanguíneas foram obtidas pela punção das veias cefálica, jugular, cardíaca ou nasal/facial (para tamanduás, apenas), utilizando-se tubos à vácuo, contendo EDTA e seringas e agulhas estéreis e descartáveis de calibre 13 x 0,45 mm (26 G) para animais de pequeno porte e agulhas de calibre 0,7x30 mm ou (22 G) ou 25x 0,8 mm (21G) para animais de médio e grande porte. O volume sanguíneo obtido foi utilizado para a realização da técnica molecular e respeitou o tamanho do animal, sendo retirado de 1 a 3 ml de sangue total. Na Figura 4 estão demonstrados alguns momentos de coleta de sangue dos animais do estudo.

² (A) - Inoculação de anestésico em onça-parda do LAPAS utilizando dardos e zarabatana. (B) e (C) - Utilização do isoflurano para indução de anestesia em anta e ouriço do CETAS-GO.

FIGURA 4: Momento da coleta de sangue total de mamíferos silvestres do estudo³

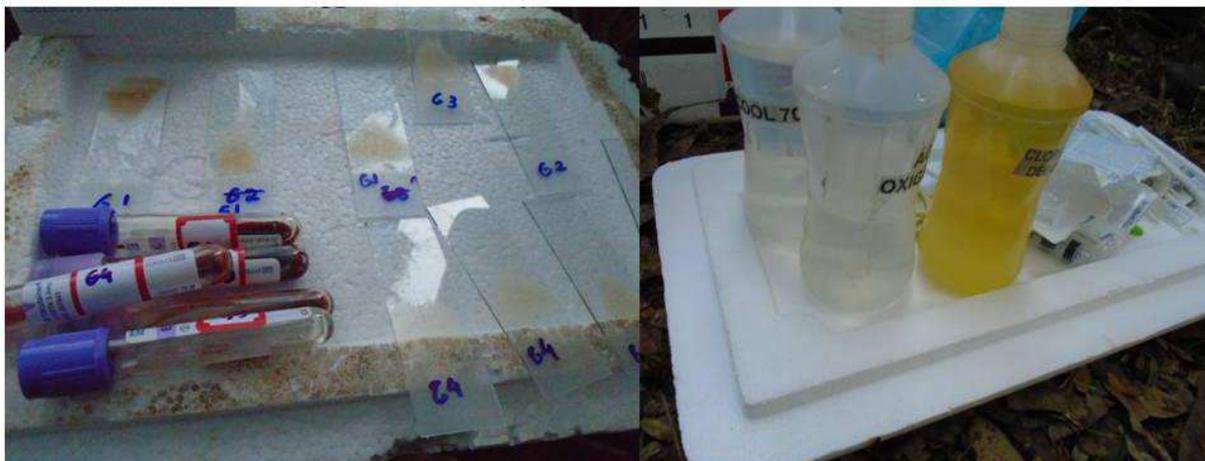


Fonte: Próprio autor (2016)

Os tubos foram colocados em isopor contendo gelo reciclável e encaminhados ao Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos, na UFU, em Uberlândia, Minas Gerais. No laboratório, as amostras sanguíneas foram alíquotadas e armazenadas a -20°C até o momento da execução das técnicas moleculares. A figura 5 ilustra os materiais utilizados na coleta de sangue total e o armazenamento do sangue após a coleta.

³ (A) - Coleta de sangue total de tamanduá-mirim pertencente ao CETAS-BH. (B) - Coleta de sangue de ouriço-cacheiro-peludo pertencente ao CETAS-GO. (C) - Coleta de sangue de onça-parda pertencente ao CETAS-GO. (D) - Coleta de sangue de tamanduá-bandeira procedente do LAPAS

FIGURA 5: Material utilizado em coleta de sangue em ambiente aberto do CETAS-GO



Fonte: Próprio autor (2016)

4.6 Coleta de sangue periférico e preparo das extensões sanguíneas

Para a identificação das formas evolutivas dos parasitos, foram confeccionadas extensões sanguíneas. Foi obtido 1 μ L de sangue periférico da ponta da orelha ou da cauda dos animais. Antes da coleta, a área foi esterilizada com álcool e gaze. As extensões foram realizadas em triplicatas, quando o volume sanguíneo obtido era suficiente. As lâminas foram encaminhadas ao Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos (UFU).

Todas as lâminas foram fixadas e coradas utilizando o método May-Grunwald-Giemsa (MGG) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), conforme descrito por Thrall et al, (2015). As lâminas foram analisadas por dois examinadores diferentes para minimizar possíveis erros, sendo observada toda a extensão das lâminas e não somente bordas ou cauda da extensão sanguínea. A Figura 5 retrata o momento de confecção e coloração de várias extensões sanguíneas verificadas pelo estudo.

FIGURA 6: Confeção e coloração de extensões sanguíneas⁴

Fonte: Próprio autor (2016)

Os hemoparasitos foram identificados de acordo com as descrições de Soulsby et al., (1982), Reagan et al, (2011), Thrall et al, (2015) e Lempereur et al, (2017). Cada extensão sanguínea foi examinada em microscópio óptico, utilizando objetiva de 100 \times , com auxílio de óleo de imersão.

4.7 Coleta e Identificação dos carrapatos

Durante a avaliação clínica, os mamíferos foram inspecionados quanto à presença de carrapatos. A coleta foi realizada de forma manual e aleatória em relação à região do corpo.

⁴ (A) - Coloração de extensões sanguíneas no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal de Uberlândia. (B) - Momento de confecção de extensões sanguíneas no LAPAS-UFU.

Quando eram encontrados carrapatos, esses foram conservados em frascos de vidro herméticos contendo álcool isopropílico. Os frascos foram vedados e devidamente identificados com dados de espécie do animal ou código e data da coleta.

A identificação de gênero e/ou espécie dos ectoparasitos foi realizada no Laboratório de Ixodídeos da UFU, utilizando critérios morfológicos e chaves dicotômicas para ninfas e adultos (BARROS-BATTESTI et al, 2006; MARTINS et al, 2010).

4.8 Técnica Molecular

Na UFU foram realizadas a extração de DNA e a Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional em todas as amostras de sangue total coletadas. A purificação e o sequenciamento foram executados no Laboratório de Doenças Parasitárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade de São Paulo (USP), em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

4.8.1 Extração de DNA (ácido desoxirribonucleico)

A extração de DNA foi realizada mediante a pré-incubação de 200 µL de sangue com 20 µL de Proteinase K e 200µL de tampão AL (tampão de lise) durante 10 minutos, a 56°C. O DNA foi isolado utilizando o kit de extração QIAmp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra foi eluída em 30µL de tampão AE (tampão de eluição).

4.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A análise molecular foi empregada como técnica de diagnóstico para hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* e ordem Piroplasmida.

Para a amplificação de *Hepatozoon* spp., inicialmente, foi realizada em todas as amostras, a PCR convencional, utilizando o par de *primers* HepF300 e Hep900. Estes *primers*

amplificam aproximadamente 600 pares de base (pb) do gene 18S rRNA do gênero *Hepatozoon* (UJVARI et al, 2004).

As amostras positivas foram submetidas à nova reação de PCR convencional, utilizando DNA genômico, usando os *primers* Hep2F e Hep2R, os quais amplificam 574 pb do gene 18S rRNA (ALMEIDA et al, 2012). Todas as amostras positivas para esta PCR foram sequenciadas.

Realizou-se uma PCR convencional utilizando os *primers* HAM-1 e HPF-2R que amplificam aproximadamente 1750 pares de base do gene 18S (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2006) nas amostras positivas da reação anterior. As amostras positivas nesta reação foram sequenciadas.

Para a amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA de agentes da ordem Piroplasmida, inicialmente, foi escolhido o par de *primers* BAB-33-57 e BAB-432-409, que amplifica 370 pb do gene 18S rRNA (SPOLIDORIO et al, 2009).

As amostras positivas na PCR utilizando BAB 33-57 e BAB 432-409 foram submetidas à nova PCR, utilizando o par de *primers* Piro 1F e Piro 5R, que amplificam, aproximadamente, 1684 pares de base do gene 18S rRNA, (KAWABUCHI et al, 2005). As amostras positivas para esta última reação de PCR foram sequenciadas. O conjunto de *primers* utilizados neste trabalho, bem como as principais informações e referências, estão descritas na Tabela 1.

Todas as reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo 13 µL de Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 9 µL de água ultrapura Milli-Q®, 1 µL de cada *primer* (*forward e reverse*) e 1 µL de DNA extraído.

A concentração dos *primers* utilizados foi de 10 pmol e foi usado para as reações 100 ng de DNA genômico extraído. Controles negativos (água ultrapura) e controles positivos foram

utilizados em todas as reações. As condições das reações no termociclador seguiram os protocolos de cada autor, citado na Tabela 1.

Os controles positivos utilizados nas reações foram amostras contendo DNA extraído de *Hepatozoon canis* e *Babesia canis*, que foram cedidos pelo Prof. Dr. Antônio Vicente Mundim, da UFU e pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, da USP.

TABELA 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas nas reações de PCR

Hemoparasito	Primer	Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon	Referência Bibliográfica
<i>Hepatozoon</i> sp.	HepF300	18S rRNA	ATACATGAGCAAAATCTCAAC	600pb	Ujvari et al (2004)
	Hep900		CTTATTATTCCATGCTGCAG		
<i>Hepatozoon</i> sp.	Hep2F	18S rRNA	GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574pb	Almeida et al (2012)
	Hep2R		ACAATAAAG TAAAAACA YTTCAAAG		
<i>Hepatozoon</i> sp.	HAM-1	18S rRNA	GCCAGTAGTCATATGCTTGTC	1765 pb	Criado-Fornélio et al (2006)
	HPF-2R		GACTTCTCCTTCGTCTAAG		
<i>Piroplasmida</i>	BAB 33-57	18S rRNA	GCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAA	370bp	Spolidorio et al, (2009)
	BAB 432-439		TTCCTTAGATGTGGTAGCCGTTTC		
<i>Piroplasmida</i>	PIRO 1F	18S rRNA	CCATGCATGTCTWAGTAYAARCTTTTA	1684pb	Kawabuchi et al.,2005)
	PIRO 5R		CCTYTAAGTGATAAGGTTACAAAACCTT		

Fonte: Próprio autor (2017)

4.8.3 Eletroforese

Os produtos amplificados foram visualizados no fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE HealthCare Life Sciences™) sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose à 1,5%, na presença de TBE 1X, corados com 6 µL de SyBr Gold (Invitrogen; Waltham, Massachusetts, EUA). Os géis de agarose foram corridos em cuba horizontal “Hoefer HE 33” (GE Healthcare®) em 110V. Os fragmentos amplificados foram comparados com marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (Ludwig®, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil).

4.8.4 Purificação e sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados utilizando ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, Nova Jersey, EUA) e, em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciamento, utilizando-se o Kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1” (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para tanto, utilizou-se o sequenciador automático (Applied Biosystems/ Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, California, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, com os mesmos *primers* utilizados na PCR.

4.8.5 Análise dos Dados

Os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse* foram editados utilizando os programas SeqMan Pro® e a identificação da espécie de cada amostra foi realizada, considerando a porcentagem de similaridade obtida no programa *online* BLASTn.⁵

⁵ Ver mais em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Gerais

Entre agosto de 2015 e abril de 2017 foram coletadas amostras sanguíneas de 152 animais distribuídos em 8 ordens, 14 famílias e 22 espécies. Foram coletadas amostras de 77 mamíferos no LAPAS-UFU, 34 indivíduos no CETAS-BH e 41 indivíduos no CETAS-GO, conforme descrição da Tabela 2.

O grupo analisado era composto por 85 machos (55,9%) e 67 fêmeas (44,0%), dos quais, 31 eram filhotes (20,3%), 30 jovens (19,7%) e 91 adultos (59,8%).

Em relação à procedência, 61 animais eram de vida livre (40,1%) e 91 de cativeiro (59,8%).

Dentre o total, 13 animais pertenciam a ordem Rodentia (8,5%), 32 a ordem Pilosa (21,0%), 26 a ordem Marsupialia (17,1%), 41 a ordem Carnivora (26,9%), 8 a ordem Artiodactila (5,2%), 28 a ordem Primata (18,4%), 2 a ordem Perissodactila (1,3%) e 2 a ordem Cingulatas (1,3%).

TABELA 2: Informações relativas às ordens, famílias e espécies dos mamíferos inseridos no estudo

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NOME POPULAR	LAPAS/UFU	CETAS/BH	CETAS/GO
Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	13	3	5
		<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	7	1	3
Rodentia	Caviidae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	2	0	0
	Erinaceinae	<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	10	0	0
		<i>Sphiggurus spinosus</i>	Ouriço-cacheiro-peludo	0	0	1
Marsupialia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelha-branca	8	12	6
Artiodactyla	Tayassuidae	<i>Pecari tacaju</i>	Cateto	0	0	1
	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	5	0	1
		<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Veado-campeiro	1	0	0
Carnivora	Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	5	0	1
		<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	2	0	3
		<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	7	1	2
	Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão-pelada	1	1	0
		<i>Nasua nasua</i>	Quati	1	1	0
	Felidae	<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaritica	2	1	0
		<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	2	0	10
	Mustelidae	<i>Eira Barbara</i>	Irara	1	0	0
Perissodactyla	Tapiridae	<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	1	0	1
Primata	Cebidae	<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufo-preto	6	14	3
	Atelidae	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio	1	0	4
Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	1	0	0
		<i>Cabassous tatouay</i>	Tatu-de-rabo-mole	1	0	0
TOTAL				77	34	41

Fonte: Próprio autor (2017)

5.2 Ocorrência de *Hepatozoon* spp.

Foram utilizadas duas formas de coleta: sangue periférico para microscopia óptica, e sangue venoso, para a PCR.

5.2.1 Técnica de microscopia óptica

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 123 animais, totalizando 352 extensões sanguíneas. Do total dos animais (n=123), nenhum apresentou gamontes do gênero *Hepatozoon* na extensão sanguínea.

5.2.2 PCR

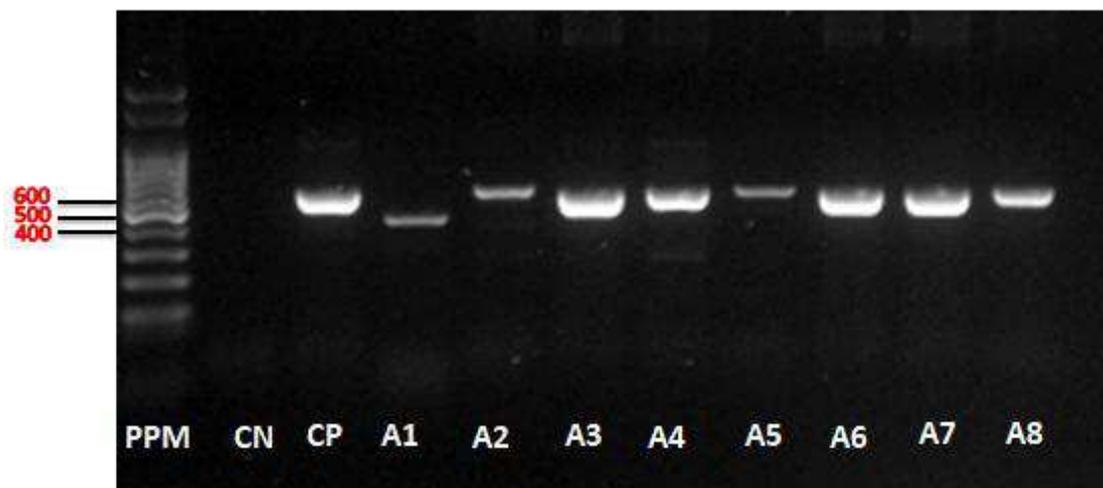
Para a técnica molecular, foram utilizadas 152 amostras de sangue venoso, usando os *primers* HepF300 e Hep900 e obteve-se 22 (14,5%) amostras positivas. Entretanto, com uso de *primers* mais específicos, Hep2F e Hep2R, observou-se oito amostras positivas (5,2%), sendo esta proporção considerada para este estudo (Tabela 4). O gel de agarose que demonstra este resultado está inserido na Figura 7.

TABELA 3: Espécies de mamíferos silvestres e respectivas procedências, que apresentaram positividade para *Hepatozoon* spp. pela PCR, com uso dos primers Hep2F e Hep2R

Nome Científico	Nome popular	Local de Coleta	Procedência
<i>Eira barbara</i>	Irara	LAPAS	Cativeiro
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	Vida Livre
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	CETAS-BH	Vida Livre
<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	CETAS-GO	Cativeiro
<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	CETAS-GO	Cativeiro
<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	CETAS-GO	Cativeiro
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	CETAS-GO	Cativeiro
<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá	CETAS-GO	Cativeiro

Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 7: Gel de agarose de amostras positivas na PCR utilizando os *primers* Hep2F e Hep2R⁶



Fonte: Próprio autor (2017)

5.2.3 Espécies de *Hepatozoon* identificadas

Foram obtidos quatro haplótipos de *Hepatozoon* spp., sendo três obtidos utilizando os *primers* Hep2F e Hep2R e um obtido utilizando os *primers* Hep2F e HPF2R.

A sequência obtida irara (*Eira barbara*), deste estudo, obteve similaridade de 98% com *Hepatozoon felis* em marta, *Martes martes*, identificação (ID) EF222257.1, em texugo-europeu, *Meles meles*, (ID KU198330) e de gato doméstico (ID KC138534.1)

A sequência de onça-parda (*Puma concolor*), deste estudo, obteve 98%-99% de similaridade com o *Hepatozoon felis* de leão asiático da Índia (*Panthera leo persica*) (ID HQ849439.1 e HQ829438.1) e de gato doméstico de Israel (ID KC138534.1).

A sequência obtida de raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) obteve 98% de similaridade com *Hepatozoon canis* em chacal-dourado, *Canis aureus*, da Romênia (ID KX712126.1), em cão doméstico do Irã (ID KX880505.1) e em gato doméstico de Israel (ID KC138532.2).

⁶ PPM: Padrão de Peso Molecular 100 pb; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; A1- Gambá (CETAS-GO); A2- Jaguatirica (CETAS-BH); A-3: Anta (CETAS-GO); A4: onça-parda (CETAS-GO); A5: Irara (LAPAS); A6 e A7: raposa-do-campo (CETAS-GO); A8: lobo-guará (LAPAS)

A sequência obtida de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) obteve similaridade de 98% com *Hepatozoon canis* de chagal-dourado (*Canis aureus*) (ID KX712124.1 e KX712127.1) e de raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (ID AY150067.2).

A Tabela 4 mostra os haplótipos de *Hepatozoon* spp. identificados entre os hospedeiros silvestres, apresentando suas procedências e local de coleta.

TABELA 4: Identidade das espécies de *Hepatozoon* em mamíferos silvestres de Minas Gerais e Goiás

Nome científico	Nome popular	Local de Coleta	Procedência	<i>Hepatozoon</i> spp. identificados	Pb obtidos
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	Vida Livre	<i>H. canis</i>	1687 pb
<i>Eira barbara</i>	Irara	LAPAS	Cativeiro	<i>H. felis</i>	525 pb
<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	CETAS-GO	Cativeiro	<i>H. felis</i>	583 pb
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	CETAS-GO	Cativeiro	<i>H. canis</i>	589 pb

Fonte: Próprio autor (2017)

5.3 Ocorrência de Piroplasmas

5.3.1 Técnica de microscopia óptica

Dos 123 animais, 43 (34,9%) apresentaram positividade para piroplasmas. As formas intraeritrocíticas observadas possuíam tamanhos e formatos variados, como anéis, gotas e vírgulas, com contorno definido, presença de núcleo e quase sempre era observada região clara envolvendo-o (membrana tri-laminada). As características destas formas são demonstradas das figuras 8 a 10.

Os animais positivos pertencem a 7 ordens (Pilosa, Primata, Perissodactila, Carnivora, Artiodactila, Marsupialia e Rodentia). As espécies, procedências e locais de coleta dos animais positivos, para piroplasmas, na microscopia óptica, estão listados na Tabela 5.

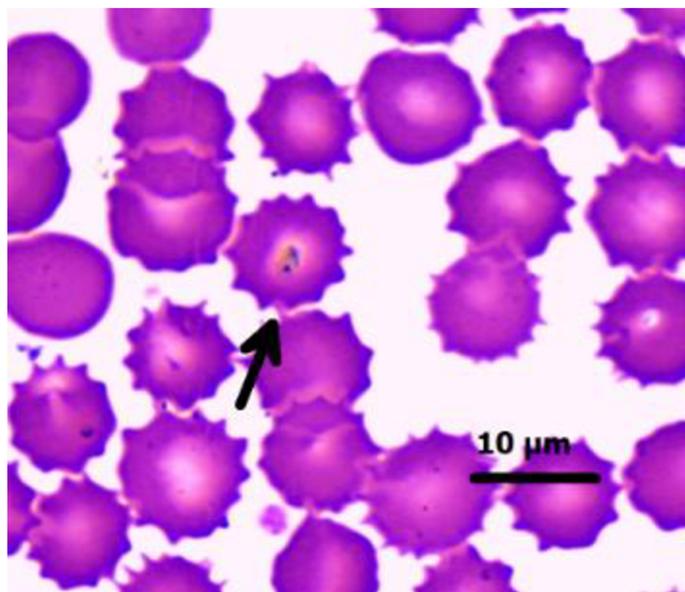
TABELA 5: Espécies de animais de três locais de coleta que foram positivos para agentes Piroplasmida, diagnosticados pelo exame microscópico

Ordem	N Positivos	Espécie	Nome popular	Local de Coleta	Procedência
Pilosa	3	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	Vida Livre
	2	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-GO	Cativeiro
	1	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-GO	Vida Livre

	2	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	Cativeiro
	2	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	CETAS-GO	Cativeiro
Marsupialia	3	<i>D. albiventris</i>	Gambá	LAPAS	Vida Livre
	2	<i>D. albiventris</i>	Gambá	CETAS-GO	Cativeiro
Rodentia	1	<i>S. spinosus</i>	Ouriço-cacheiro-peludo	CETAS-GO	Vida Livre
Perissodactila	1	<i>T. terrestris</i>	Anta	CETAS-GO	Cativeiro
Artiodactila	1	<i>M. gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>P. tajacu</i>	Cateto	CETAS-GO	Cativeiro
Carnivora	4	<i>C. thous</i>	Cachorro-do-mato	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>C. thous</i>	Cachorro-do-mato	CETAS-GO	Cativeiro
	1	<i>L. vetulus</i>	Raposa-do-campo	CETAS-GO	Cativeiro
	1	<i>L. pardalis</i>	Jaguatirica	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>P. concolor</i>	Onça-parda	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>P. concolor</i>	Onça-parda	CETAS-GO	Cativeiro
	1	<i>P. cancrivorus</i>	Mão-pelada	LAPAS	Vida Livre
Primata	6	<i>C. penicillata</i>	Sagui	LAPAS	Cativeiro
	4	<i>C. penicillata</i>	Sagui	CETAS-BH	Cativeiro
	1	<i>C. penicillata</i>	Sagui	CETAS-GO	Cativeiro
	1	<i>A. caraya</i>	Bugio	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>A. caraya</i>	Bugio	CETAS-GO	Cativeiro
Total	43				

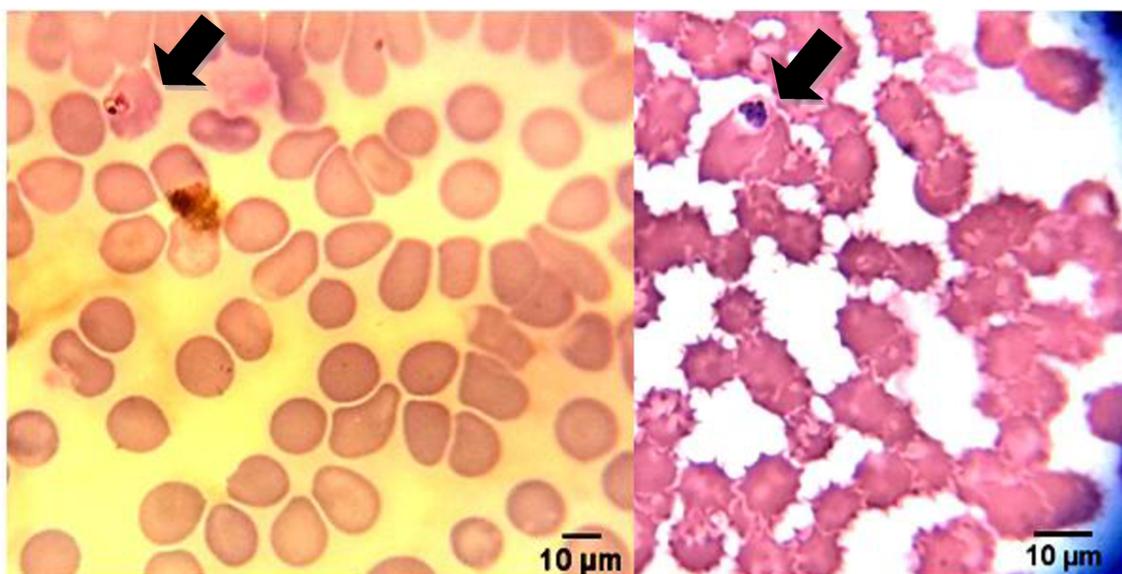
Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 8: Ilustração de piroplasma em extensão sanguínea de *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) procedente do LAPAS⁷



Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 9: Ilustrações de piroplasmas em extensões sanguíneas de mamíferos silvestres identificados pela microscopia óptica⁸

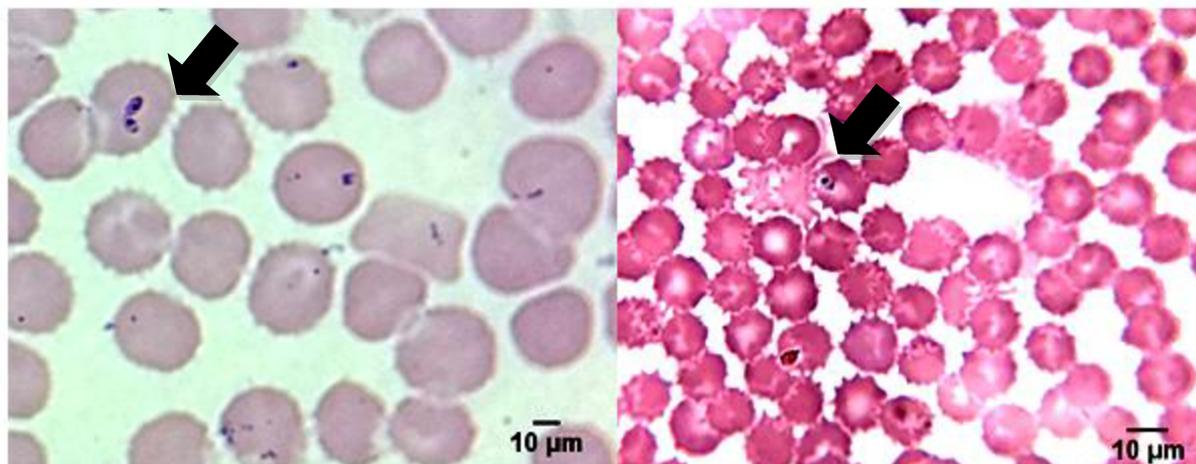


Fonte: Próprio autor (2016)

⁷ A seta indica piroplasma no interior de eritrócito de *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) procedente do LAPAS. O parasito possui formato de vírgula, com visualização do núcleo e membrana envolvendo o hemoparasito. Aumento de 1000x.

⁸ Na figura à esquerda, a seta indica eritrócito, de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) procedente do LAPAS, infectado por piroplasma, maior que 5 µm, de formato anelar. Na figura à direita, a seta indica três merozoítos no interior de eritrócito de *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) procedente do LAPAS. Os hemoparasitos possuem formato de gotas e estão inseridos em membrana de cor clara dentro de eritrócito (membrana tri-laminada). Nota-se o tamanho aumentado do eritrócito infectado se comparado aos não-infectados. Aumento de 1000x.

FIGURA 10: Ilustrações de piroplasmas em extensões sanguíneas de mamíferos silvestres identificados pela microscopia óptica⁹



Fonte: Próprio autor (2016)

5.3.2 PCR

A PCR foi realizada nos 152 animais, sendo a ocorrência para a ordem Piroplasmida de 26,3%, em 40 animais positivos. O número, de espécies, da procedência e do local de coleta destes animais estão incluídos na Tabela 6.

⁹ Na figura à esquerda, a seta indica piroplasma no interior de eritrócito de gambá (*Didelphis albiventris*) procedente do LAPAS. O hemoparasito, maior que 5µm, possui formato de dímero. Na figura à direita, a seta indica piroplasma intraeritrocítico em *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim) procedente do LAPAS, em formato de vírgula, sendo possível visualização de núcleo. Aumento de 1000x.

TABELA 6: Espécies de mamíferos que foram positivos para agentes Piroplasmida pela PCR utilizando os primers BAB-33-42/432-409

Ordem	n positivos	Espécie	Nome popular	Local de Coleta	Procedência
Rodentia	4	<i>C. prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	LAPAS	Vida Livre
	3	<i>C. prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>H. hydrochaeris</i>	Capivara	LAPAS	Vida Livre
Perissodactyla	1	<i>T. terrestris</i>	Anta	CETAS-GO	Cativeiro
Carnivora	2	<i>C. thous</i>	Cachorro-do-mato	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>C. thous</i>	Cachorro-do-mato	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>C. thous</i>	Cachorro-do-mato	CETAS-BH	Cativeiro
	1	<i>C. brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	Cativeiro
	2	<i>L. pardalis</i>	Jaguatirica	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>L. pardalis</i>	Jaguatirica	CETAS-BH	Vida Livre
	1	<i>P. cancrivorus</i>	Mão-pelada	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>P. cancrivorus</i>	Mão-pelada	CETAS-BH	Cativeiro
	1	<i>N. nasua</i>	Quati	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>N. nasua</i>	Quati	CETAS-BH	Cativeiro
	1	<i>E. barbara</i>	Irara	LAPAS	Cativeiro
	3	<i>L. vetulus</i>	Raposa-do-campo	CETAS-GO	Cativeiro
	Artiodactyla	1	<i>M. gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	LAPAS
1		<i>O. bezoarticus</i>	Veado-campeiro	LAPAS	Vida Livre
Marsupialia	4	<i>D. albiventris</i>	Gambá	LAPAS	Vida Livre
Primata	4	<i>C. penicillata</i>	Sagui	LAPAS	Cativeiro
	1	<i>A. caraya</i>	Bugio	LAPAS	Cativeiro
Pilosa	1	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-BH	Cativeiro
	1	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	Vida Livre
	1	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	CETAS-BH	Cativeiro
TOTAL	40				

Fonte: Próprio autor (2017)

5.3.3 Espécies de piroplasmas identificadas

Obteve-se três haplótipos similares à agentes da ordem Piroplasmida em mamíferos deste estudo, utilizando os *primers* Piro1F e Piro 5R, os quais amplificam porção quase total do gene 18S rRNA (Figura 11). Os animais positivos foram veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e anta (*Tapirus terrestris*).

Na sequência identificada em veado-catingueiro, deste estudo, observou-se 99% de similaridade com *Theileria cervi* identificada cervídeos dos Estados Unidos: de uapiti, *Cervus*

canadensis (ID AY735129.1), de veado-de-cauda-branca, *Odocoileus virginianus*, (ID AY735122.1) e de alce indiano (*Indian elk*) (ID AY735119.1).

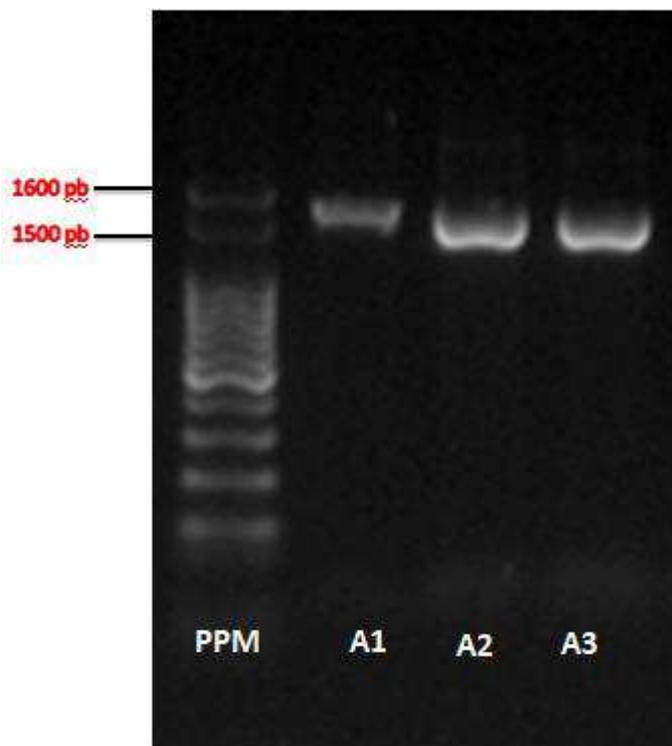
Em sequência obtida de jaguatirica, deste estudo, observou-se 99% de similaridade com sequências de *Cytauxzoon felis* de jaguatirica do Brasil (ID GU903911.1) e de gatos domésticos dos Estados Unidos (ID AF399930.1 e AY679105.1).

Em sequência de anta, deste estudo, observou-se 95% de similaridade com sequência de *Theileria equi* de cultivo celular (ID CP001669.1) e equinos domésticos da Espanha e da África, (ID AY150062.2 e Z15105.1).

As sequências de *Hepatozoon* spp. e piroplasmas obtidas neste estudo não apresentaram total similaridade com as depositadas no GenBank. Deste modo, a deposição das sequências deste trabalho no GenBank, bem como a confecção da árvore filogenética e a publicação dos resultados serão realizados em momento oportuno.

A Tabela 7 lista características das sequências obtidas, bem como os hospedeiros dos hemoparasitos identificados.

FIGURA 11: Gel de agarose ilustrando amostras positivas na PCR utilizando os *primers* Piro 1F e Piro 5R¹⁰



Fonte: Próprio autor (2017)

TABELA 7: Espécies de piroplasmas observados em mamíferos silvestres positivos na PCR utilizando os *primers* Piro 1F e Piro 5R, procedentes do LAPAS e CETAS-GO

Nome científico	Nome popular	Local de Coleta	Procedência	Espécies identificadas	Pares de base obtidos
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	LAPAS	Vida Livre	<i>Theileria cervi</i>	1545 pb
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	LAPAS	Cativeiro	<i>Cytauxzoon felis</i>	1577 pb
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	CETAS-GO	Cativeiro	<i>Theileria equi</i>	1540 pb

Fonte: Próprio Autor (2017)

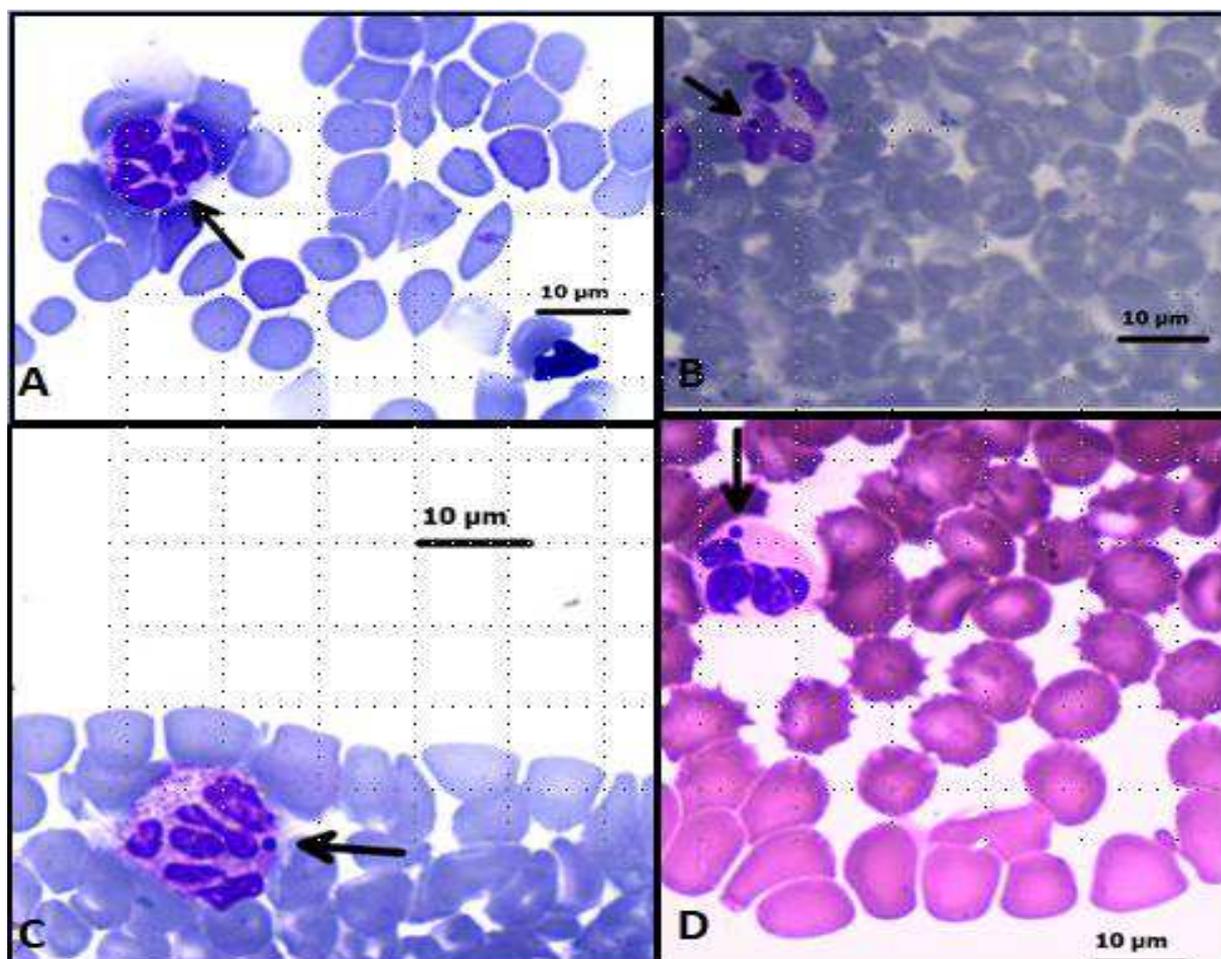
¹⁰ Gel de agarose de amostras positivas na PCR utilizando os primers Piro 1F e Piro 5R: PPM: Padrão de Peso Molecular; A1: veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*); A2: jaguaririca (*Leopardus pardalis*) e A3: anta (*Tapirus terrestris*).

5.4 Infecções concomitantes

Nas extensões sanguíneas (n=123) também foram observadas inclusões em neutrófilos sugestivos para *Ehrlichia* spp. em 23 animais (18,6%), conforme pode-se observar na Figura 12.

Essas inclusões estavam presentes nos animais da ordem Pilosa (um tamanduá-bandeira e dois tamanduás-mirim), Marsupialia (dois gambás), Carnivora (dois lobos-guará, dois cachorros-do-mato, três jaguatiricas, duas onças-pardas e uma raposa-do-campo); Primata (6 saguis e um bugio) e Perissodactyla (um cateto).

FIGURA 12: Inclusões em neutrófilos sugestivas para *Ehrlichia* spp. (setas) presentes em neutrófilos de mamíferos silvestres do estudo¹¹

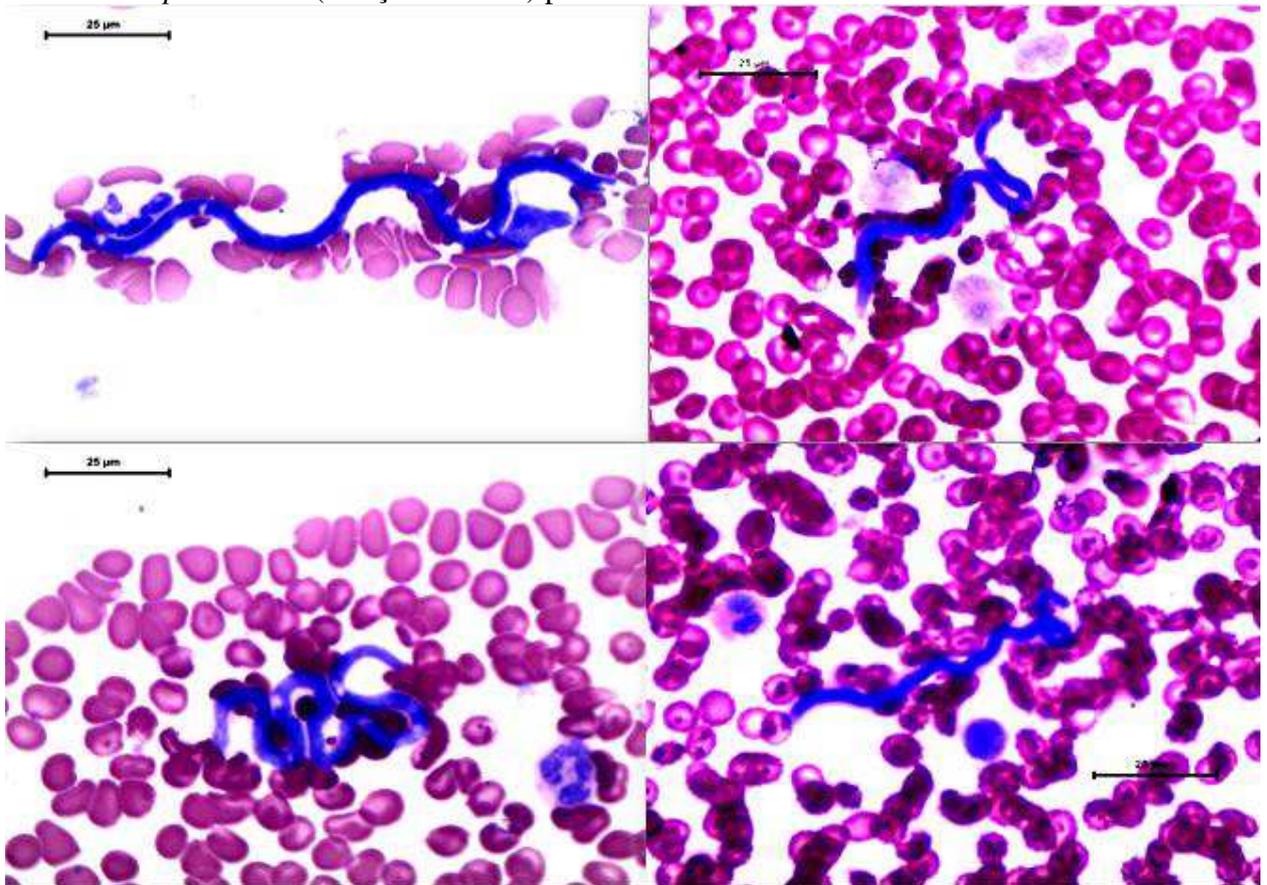


Fonte: Próprio autor (2017)

¹¹ A., B e C: Neutrófilos de primatas de espécie *Callithrix penicillata* (sagui-de-tufo-preto) procedentes do CETAS-BH. D. Neutrófilos de *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) procedente do LAPAS. Aumento de 1000x.

Também foram observadas microfilárias em extensões sanguíneas de dois ouriços-cacheiros procedentes do LAPAS. Entretanto, notou-se a ausência de bainha nas mesmas. Devido a essa característica, pode-se inferir que as microfilárias pertencem à família Onchocercidae (Figura 13).

FIGURA 13: Microfilárias visualizadas em extensão sanguínea de roedor silvestre *Coendou prehensilis* (ouriço-cacheiro) procedente do LAPAS - Aumento de 400x



Fonte: Próprio autor (2016)

5.5 Infestação por carrapatos

Foram coletados carrapatos em 30 dos 152 animais inspecionados (19,7%). Nesses, foram coletados 423 carrapatos, sendo 360 adultos e 63 ninfas, os quais foram identificados em dois gêneros: *Amblyomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. As espécies encontradas foram: *Amblyomma nodosum*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *A. longirostre* e *A. dubitatum*, *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus*. A Tabela 8 lista as espécies de carrapatos

identificados, em hospedeiros mamíferos, o local de coleta, bem como a procedência destes animais. Das figuras 14 a 17 estão ilustradas espécies de carrapatos identificados neste estudo, bem como as principais características morfológicas que podem ser vistas nas figuras.

TABELA 8: Principais gêneros e espécies de carrapatos encontrados nas diferentes espécies de mamíferos procedentes do LAPAS, CETAS-BH /GO coletados no período de agosto de 2015 a abril de 2017

Ordem	Mamífero	Nome popular	Local de Coleta	Origem do mamífero	Número e espécies de ectoparasitos identificados
Pilosa	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberaba-MG	1 <i>A. nodosum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	35 <i>A. nodosum</i> / 1 <i>Amblyomma</i> spp.
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberaba-MG	54 <i>A. nodosum</i> / 10 <i>A. parvum</i> / 21 <i>Amblyomma</i> spp. / 76 <i>A. sculptum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	1 <i>A. nodosum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Coromandel-MG	5 <i>A. sculptum</i> / 3 <i>A. parvum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	10 <i>A. nodosum</i> / 16 <i>Amblyomma</i> spp.
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	8 <i>A. sculptum</i> / 18 <i>Amblyomma</i> spp.
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	3 <i>A. nodosum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-GO	(VL) Morrinhos-GO	2 <i>A. sculptum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-GO	(VL) Anápolis-GO	1 <i>A. sculptum</i>
	<i>M. tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	CETAS-GO	(VL) Caldas Novas- GO	2 <i>R. microplus</i> / 2 <i>A. sculptum</i>
	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	56 <i>A. nodosum</i> / 2 <i>R. sanguineus</i>
	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	6 <i>A. sculptum</i>
	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	1 <i>A. nodosum</i>
	<i>T. tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	CETAS- BH	(C)	1 <i>A. sculptum</i>
Rodentia	<i>C. prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	LAPAS	(C)	1 <i>A. longirostre</i>
	<i>C. prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	LAPAS	(C)	7 <i>A. longirostre</i>
	<i>C. prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	LAPAS	(C)	1 <i>A. longirostre</i>
	<i>S. spinosus</i>	Ouriço-cacheiro-peludo	CETAS GO	(VL) Goiânia- GO	1 <i>A. sculptum</i>
	<i>H. hydrochaeris</i>	Capivara	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	34 <i>A. dubitatum</i> / 2 <i>A. sculptum</i> / 2 <i>Amblyomma</i> spp.
	<i>H. hydrochaeris</i>	Capivara	LAPAS	(VL) Ituiutaba-MG	1 <i>A. dubitatum</i> / 1 <i>Amblyomma</i> spp.

Continuação...

Ordem	Mamífero	Nome popular	Local de Coleta	Origem do mamífero	Número e espécies de ectoparasitos identificados
Carnivora	<i>C. brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	1 <i>R. sanguineus</i> / 2 <i>R. microplus</i>
	<i>C. brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	1 <i>Amblyomma</i> spp.
	<i>C. brachyurus</i>	Lobo-guará	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	3 <i>A. ovale</i>
	<i>E. barbara</i>	Irara	LAPAS	(C)	1 <i>A. ovale</i>
Artiodáctila	<i>M. gouazoubira</i>	Veado catingueiro	LAPAS	(VL) Araguari-MG	7 <i>R. microplus</i>
	<i>M. gouazoubira</i>	Veado catingueiro	LAPAS	(VL) Uberlândia-MG	9 <i>R. microplus</i>
	<i>O. bezoarticus</i>	Veado campeiro	LAPAS	(VL) Paracatu-MG	1 <i>Rhipicephalus</i> spp./ 2 <i>Amblyomma</i> spp./ 1 <i>R. microplus</i>
Perissodáctila	<i>T. terrestris</i>	Anta	LAPAS	(VL) Ituiutaba-MG	4 <i>A. nodosum</i>
	<i>T. terrestris</i>	Anta	CETAS- GO	(C)	6 <i>A. sculptum</i>

Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 14: *Amblyomma longirostre* coletado de ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) procedente do LAPAS¹²



Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 15: *Amblyomma ovale* em irara (*Eira barbara*) procedente do LAPAS¹³

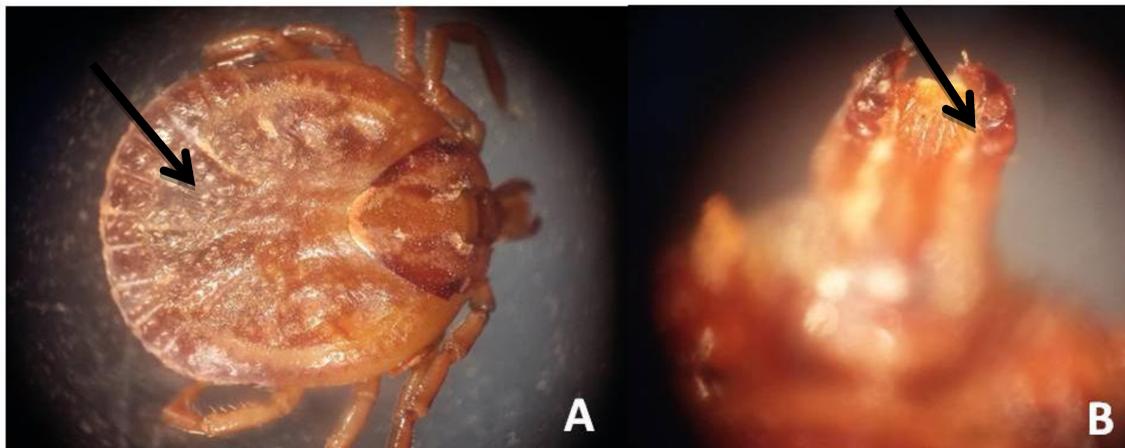


Fonte: Próprio autor (2017)

¹² Observa-se ornamentação característica do escudo: manchas esverdeadas e acobreadas e a seta indica sulcos marginais cobrindo até o terceiro festão.

¹³ (A) - A seta indica presença de poro genital evidenciando estágio adulto. (B) - A seta indica sulco marginal completo e pontuações homogêneas no escudo.

FIGURA 16: *Amblyomma sculptum* em *Tapirus terrestris* procedente do CETAS-GO¹⁴



Fonte: Próprio autor (2017)

FIGURA 17: Identificação de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) do LAPAS¹⁵



Fonte: Próprio autor (2016)

¹⁴ (A) - A seta indica manchas esbranquiçadas na porção anterior do escudo e presença de pontuações homogêneas. (B) - A seta indica dentição 3/3.

¹⁵ Casal de *Amblyomma nodosum*, fêmea à esquerda e macho com ornamentação característica no escudo, mancha esbranquiçada em formato de J (seta).

6 DISCUSSÃO

Mamíferos silvestres são hospedeiros de inúmeros hemoparasitos desconhecidos. O desconhecimento destes agentes deve-se aos poucos estudos e também por alguns hemoparasitos não causarem sinais clínicos evidentes nesses animais (PENZHORN, 2006). O estudo destes parasitos inclui o uso de técnicas de diagnóstico diretos, em que se observa o agente na amostra ou exames que são capazes de detectar o DNA destes hemoparasitos (PENZHORN, 2006; YABSLEY et al, 2013).

Nesse estudo, o número amostral foi diferente para as duas técnicas de diagnóstico empregadas (esfregaço sanguíneo e PCR). Isso ocorreu devido a alguns animais apresentarem agressividade, necessidade de sedação, debilidade e, por muitas vezes, a coleta ser realizada por terceiros. Estes fatores podem interferir no volume sanguíneo, assim como na qualidade da extensão sanguínea realizada. Nesse estudo, o baixo volume sanguíneo periférico impediu que se realizasse a extensão em 29 animais.

O exame microscópico, realizado em 123 animais, não detectou a presença de gamontes de *Hepatozoon* spp., neste estudo. Esse resultado corrobora com os de Criado-Fornélio et al. (2009) e de Souza et al. (2017), que, igualmente, não encontraram formas evolutivas do gênero *Hepatozoon* nas extensões de mamíferos silvestres. Segundo Modrý et al (2017), métodos de diagnóstico tradicionais diretos como microscopia óptica, são efetivos em animais que possuem alta parasitemia. O'Dwyer et al (2001) complementam esta conclusão, quando mencionam que hepatozoonose é uma doença crônica de parasitemia intermitente, o que dificultaria o encontro de gametócitos circulantes, principalmente, em baixas parasitemias.

Em relação à técnica molecular utilizada, os *primers* HepF300 e Hep900 são considerados específicos para detecção de *Hepatozoon* spp. pela PCR (UJVARI et al., 2004; MAIA et al., 2014; DEMONER et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Entretanto, ao

utilizar estes *primers*, observou-se que o sequenciamento não amplificou hemoparasitos para esse gênero, contradizendo os relatos dos autores na literatura. Isso ocorreu, pois este par de *primers* possui falha em seu desenho, em que os seis primeiros nucleotídeos do “*primer forward*” (ATACAT) e os cinco primeiros nucleotídeos do “*primer reverse*” (CTTAT) são comuns às sequências de *Hepatozoon*, *Theileria* e *Cytauxoon*. Além disso, inserindo o *primer reverse* (Hep900) na plataforma *online* “BLASTn”, observa-se que sua sequência gênica é comum à *Eimeria* spp. e *Toxoplasma gondii*, evidenciando, mais uma vez, o caráter não específico do *primer* em questão.

Diferentemente, os *primers* Hep2F e Hep2R mostraram-se eficientes na amplificação de *Hepatozoon* spp. Utilizando a plataforma “BLASTn”, observou-se que as sequências genéticas que o *primer* possui são compatíveis aos gêneros incluídos na ordem Adeleorina (*Hepatozoon* spp. e *Hemolivia* spp.), comprovando a especificidade.

A prevalência de *Hepatozoon* spp. observada (5,2%) neste trabalho, utilizando métodos moleculares, foi inferior aos resultados de Soares et al, (2017) no Mato Grosso, os quais, utilizando os mesmos *primers* que o deste estudo (Hep2F e Hep2R), obtiveram 10,2% de positividade pela PCR em mamíferos silvestres de vida livre. Porém, esses mesmos autores observaram menor positividade de *Hepatozoon* spp. em mamíferos silvestres de vida livre no Pará (1,5%), sendo esta proporção, menor que a deste trabalho. A diferença dos resultados pode estar associada ao número amostral, à quantidade de DNA do patógeno nas amostras, à presença do vetor, à sazonalidade, à região geográfica do estudo, às ordens dos animais e ao modo de extração de DNA.

Nas quatro amostras positivas e sequenciadas para esse gênero, observou-se a presença de *Hepatozoon felis* em irara e onça-parda e *Hepatozoon canis* em raposa-do-campo e lobo-guará.

A sequência observada na amostra da irara, carnívoro mustelídeo da espécie *Eira barbara*, desse trabalho, foi similar à *H. felis* de mamíferos pertencentes à família Mustelidae da Europa e a um felino doméstico de Israel (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2009). Essa similaridade sugere que espécies de *Hepatozoon* de canídeos e felinos podem estar em adaptação aos novos hospedeiros, sendo os mustelídeos susceptíveis a *Hepatozoon*. Da mesma forma, Criado-Fornélio et al (2009) identificaram sequência similar de *H. felis* procedente de gatos da Espanha, em mustelídeo europeu (marta). Os autores sugeriram que esses mamíferos silvestres poderiam ser reservatórios incomuns de hematozoários de caninos e felinos na Europa. O resultado deste trabalho corrobora com o relato desses autores, sendo esse, o primeiro estudo no qual se observa o envolvimento da espécie silvestre irara (*Eira barbara*), como hospedeiro de *Hepatozoon* spp., no Brasil.

A sequência identificada em onça-parda no presente trabalho, obteve similaridade com *Hepatozoon felis* de felídeos silvestres da Índia e de gato doméstico de Israel. Este resultado corrobora com outros estudos que identificaram *H. felis* em espécies de felinos como *Leopardus pardalis* (jaguatirica), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato), *Puma yagouaroundi* (gato jaguarundi) e *Panthera onca* (onça-pintada) (METZGER et al, 2008; WIDMER et al, 2009; ANDRÉ et al, 2010; SOUZA et al, 2017; SOARES et al, 2017; FURTADO et al, 2017), demonstrando que felinos silvestres do mundo e do Brasil, comportam-se como hospedeiros deste patógeno. Ressalta-se que essa onça-parda estava em cativeiro por aproximadamente dez anos, sem apresentar sinais clínicos e com boas condições de saúde. A partir disso, pode-se conjecturar que a transmissão tenha ocorrido em ambiente de cativeiro e tal hospedeiro é fonte de infecção de *Hepatozoon* spp.

A similaridade observada nas sequências de *Hepatozoon* encontradas em raposa-do-campo e lobo-guará, deste trabalho, com as sequências de *H. canis* de canídeos silvestres europeus, foi observada neste estudo e corrobora com Duscher et al (2013) e Farkas et al (2014) que, canídeos silvestres podem também ser hospedeiros de *Hepatozoon canis*, cuja distribuição é cosmopolita.

A raposa-do-campo em questão estava confinada no LAPAS, sem informações precisas do tempo de cativeiro. Os recintos dos animais silvestres são próximos ao canil do Hospital Veterinário da UFU. Dessa forma, pode-se conjecturar um possível contato dos vetores com esses animais.

O lobo-guará identificado com *H. canis*, era de vida livre e foi encontrado próximo à Uberlândia-MG. A região é endêmica para *H. canis* tanto em cães domésticos quanto de área rural, havendo grande proporção de vetores (MIRANDA et al, 2014). Apesar de não se saber o tempo que este animal estava no entorno, existe a possibilidade que tenha entrado em contato com algum vetor e, dessa forma, se infectado.

A presença de piroplasmas tanto na extensão sanguínea quanto na PCR de carnívoros silvestres deste estudo, corrobora com os achados de vários autores (PARAENSE; VIANA, 1948; THOISY et al, 2000; ANDRÉ et al, 2011; FREDO et al, 2015; SOUZA et al, 2017).

A prevalência observada neste trabalho para piroplasmas (34,9%), utilizando a microscopia óptica, foi maior do que os relatos realizados por Thoisy et al, (2000) e Ayala et al, (1972), os quais observaram 0,7% a 4,6% de positividade em mamíferos, respectivamente.

Em mamíferos silvestres, a maioria dos estudos relacionados à ocorrência de piroplasmídeos não utilizam extensão sanguínea como método de diagnóstico. Os

autores relacionam isso às falhas eventuais que a microscopia óptica apresenta frente a baixas parasitemias (CRIADO-FORNÉLIO et al, 2006; CRIADO-FORNÉLIO et al, 2009). As formas evolutivas destes parasitos são pequenas e podem ser facilmente confundidas com corpúsculos de Howell-Jolly e artefatos na lâmina (REAGAN et al, 2011; LEMPEREUR et al, 2017). Deve-se enfatizar que, nesse estudo procurou-se minimizar o máximo de erros com mais de um examinador por lâmina.

Utilizando a PCR, a ocorrência obtida nesse estudo (26,3%) foi inferior aos resultados de Tampieri et al (2008) e Soares (2014), que encontraram 30,4% e 46,4%, respectivamente, de positividade em mamíferos incluindo carnívoros, cervídeos e ruminantes silvestres. Entretanto, foi superior aos de Barbosa (2017), com 5,6% em roedores, e Lewis (2012) com 11,4% em felinos. Todos os autores utilizaram a PCR como método de diagnóstico.

Os *primers* BAB, utilizados na análise molecular de piroplasmídeos, são genéricos e amplificam curta região (370 pb) do gene 18S rRNA de agentes da ordem Piroplasmida, sendo ideais para fornecer diagnóstico para a ordem de piroplasmídeos. As informações fornecidas por esses *primers* são curtas sequências gênicas que, possivelmente, podem não ser suficientes para discriminar o resultado entre espécies ou fornecer informações aprofundadas sobre a análise filogenética. Segundo a literatura, a amplificação de porções maiores do gene 18S fornecem melhores informações para discriminar espécies, fazendo com que o diagnóstico seja preciso (OOSTHUIZEN et al, 2008; BHOORA et al, 2009).

As sequências de piroplasmas obtidas nesse trabalho, foram similares à *Theileria cervi*, *Cytauxzoon felis* e *Theileria equi*, com pares de base entre 1540 a 1577.

Em amostras sanguíneas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) deste estudo, a sequência obtida foi similar à *Theileria cervi*, a qual também foi identificada

em cervídeos silvestres dos Estados Unidos. Esta sequência também foi encontrada em cervídeos de diferentes regiões geográficas tais como Minas Gerais, Pantanal e Amazônia (SILVEIRA et al, 2011; 2013; SOARES et al, 2017). Até o presente momento não é conhecido o vetor implicado na transmissão deste patógeno no Brasil, visto que o vetor conhecido na América do Norte, *Amblyomma americanum*, não ocorre na América do Sul (SILVEIRA et al, 2011). Esse cervídeo era de vida livre e, possivelmente, adquiriu infecção em ambiente natural no qual foi exposto a vetores.

A sequência obtida de jaguatirica mantida em cativeiro deste estudo, foi similar à de *Cytauxzoon felis* de felino silvestre do Brasil (jaguaririca) e gatos domésticos dos Estados Unidos. Esse achado representa mais um dado sobre a ocorrência de *Cytauxzoon felis* nos felídeos silvestres do Brasil. Vários pesquisadores têm demonstrado interesse no estudo epidemiológico desse parasito em felídeos silvestres de ambiente livre e de cativeiro (PEIXOTO et al, 2008; ANDRÉ, et al, 2009; FILONI et al, 2012; FURTADO et al, 2017; SOARES et al, 2017).

André et al, (2009), Filoni et al, (2012), Furtado et al, (2017) e Soares et al, (2017) estudando felinos silvestres de cativeiro e de vida livre, observaram que estes não apresentavam sintomatologia, apesar de evidenciarem positividade para *C. felis*. Porém, Peixoto et al. (2008), diagnosticaram *C. felis* em um leão mantido em cativeiro, o qual desenvolveu sinais clínicos compatíveis com a parasitose, vindo a óbito.

A sequência de *C. felis* identificada em jaguatirica deste estudo, obteve similaridade com a sequência realizada por Filoni et al (2012), nessa mesma espécie de animal, que estava há nove anos em cativeiro. Vários autores relataram que felídeos silvestres podem ser reservatórios naturais desse parasito (ANDRÉ et al, 2009; FURTADO et al, 2017). Sendo assim, esses animais são os dispersores desse patógeno, bastando para isso ter o vetor no ambiente (MILLÁN et al, 2007).

Em relação à presença de espécies de *Theileria*, a anta mantida em cativeiro no CETAS-GO apresentou sequência de *Theileria equi*, a qual foi similar às observadas em equinos. Este resultado corroborou com o de Silveira et al (2017) que, pela primeira vez registraram *T. equi*, em anta de vida livre, no Brasil. Os autores atribuíram a infecção de *T. equi*, nessa espécie silvestre, por esta estar no mesmo ambiente que equinos positivos para o patógeno e em presença de vetores competentes.

Neste estudo, a sequência obtida em anta foi 95% similar à *T. equi*, sendo provável observar, após a análise filogenética, que o patógeno encontrado não é *T. equi* propriamente dito, sendo, possivelmente, outra espécie pertencente ao gênero *Theileria*, visto a quantidade de nucleotídeos diferentes entre as sequências de *Theileria equi* depositadas no GenBank e a sequência obtida neste estudo.

Além desses hemoparasitos, outros foram observados no presente estudo. Pela microscopia óptica verificou-se ocorrência de *Ehrlichia* spp. (18,6%) e os grupos de mamíferos mais acometidos foram carnívoros e primatas.

Vários são os estudos que relatam a ocorrência de *Ehrlichia* spp. em carnívoros silvestres no Brasil, concordando com o resultado deste estudo. Os relatos foram em onças-pardas, jaguatiricas, onça-pintada e cachorro-do-mato (FILONI et al, 2016; ANDRÉ et al, 2010; ALMEIDA et al, 2013).

Mafra et al (2015) foram os primeiros a encontrarem *Ehrlichia* spp. em primatas do gênero *Callithrix* em Minas Gerais. O encontro desse parasito nessa espécie de animal faz com que esse segundo relato abra portas para mais pesquisas envolvendo *Ehrlichia* spp. e primatas.

Nas extensões sanguíneas de dois ouriços-cacheiros (Família Erethizontidae) foram visualizadas microfilárias, resultado idêntico ao de De Thoisy et al (2000) que também encontraram vários ouriços infectados com filárias (mais de 40% dos ouriços).

De acordo com Anderson (2000), os filarídeos que acometem esses animais pertencem ao gênero *Acanthocheilonema*. Nesse estudo, o diagnóstico dado às microfilárias foi genérico, pois não foi possível visualizar estruturas internas do parasito, que seriam importantes para a determinação de espécie. Os animais eram de vida livre, encontrados próximos ao município de Uberlândia-MG. Os animais parasitados apresentaram no exame clínico, edema, principalmente, na face e vieram a óbito poucos dias após a coleta de sangue.

O encontro de filarídeos em ouriços-cacheiros procedentes da região de Uberlândia é importante, pois alerta a comunidade científica para a necessidade de estudos, objetivando a identificação dos gêneros e espécies de filárias que acometem esses animais, assim como a biologia e epidemiologia dos mesmos.

Alguns animais albergavam carrapatos, sendo a maioria de vida livre. Os ectoparasitos observados em alguns animais desse trabalho eram espécies específicas, tendo como exemplo *Amblyomma dubitatum* que é, de acordo com a literatura, comum em capivaras (SARAIVA et al, 2012).

O ectoparasito *Amblyomma ovale* foi restrito a carnívoros, corroborando com a literatura que menciona que os estágios imaturos desta espécie de carrapato são encontrados em roedores e marsupiais e, os estágios adultos parasitam, principalmente, carnívoros silvestres e domésticos (SARAIVA et al, 2012; GUGLIEMONE et al, 2014).

Foram identificados carrapatos de espécies *Amblyomma nodosum* e *Amblyomma sculptum* em tamanduás, sendo achado semelhante com estudos que identificaram esses ectoparasitos em tamanduás no Parque Nacional das Emas, Goiás, Brasil (BECHARA et al, 2002) e em tamanduás de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (GARCIA et al, 2013). Apesar de serem encontrados com maior frequência nos membros da família Myrmecophagidae (PEREIRA et al, 2000; GUGLIELMONE et al, 2003;

ARZUA et al, 2005), também foi observado *Amblyomma nodosum* em *Tapirus terrestris* (anta) de vida livre procedente do LAPAS.

A espécie *Amblyomma longirostre* foi identificada em ouriços-cacheiros do estudo. Esta espécie de carrapato, tem populações estabelecidas do Panamá à Argentina, e no Brasil ocorre na região sudeste (JONES et al, 1972, GUIMARÃES et al, 2001). Essa espécie de carrapato parasita ouriços, no estágio adulto, e aves nos estádios larvais (ARAGÃO, 1936, JONES et al, 1972). Labruna et al (2004) comprovaram, por exame molecular, a ocorrência de nova espécie de *Rickettsia*, transmitida por esse carrapato, proximamente relacionada à *Rickettsia amblyommii*, pertencente ao grupo de febre maculosa. Desta forma, essa espécie de carrapato merece atenção, devido à transmissão de agentes de potencial zoonóticos comprovados.

Nos animais em que foi possível obter sequências genéticas de hemoparasitos, alguns estavam parasitados por carrapatos e, devido a isso, é possível estabelecer algumas inferências.

No *Tapirus terrestris* (anta) que apresentou sequência similar à *T. equi*, foram encontrados seis carrapatos de espécie *A. sculptum*. *Rhipicephalus microplus* é considerado o principal vetor de *T. equi* no Brasil (Battsetseg et al, 2002), porém evidências têm sugerido a participação de *A. cajennense sensu lato* no ciclo de transmissão de *T. equi* (Scoles and Ueti, 2013). Em estudo, Souza et al, (2017) detectaram DNA de *T. equi* em *Amblyomma parvum*. O encontro de *A. sculptum* em anta parasitada com *T. equi* demonstraram que é importante a continuação de estudos em espécies do gênero *Amblyomma*, pois é provável que estejam participando do ciclo epidemiológico de *T. equi*.

No lobo-guará, parasitado com *H. canis*, foi identificado um espécime de carrapato (ninf) *Amblyomma* spp. A literatura relata possível participação de carrapatos

desse gênero na transmissão de *Hepatozoon* sp. no Brasil (O'DWYER et al, 2001; FORLANO et al, 2005), sendo este resultado, um indicativo de encontro de possível vetor implicado na transmissão de *H. canis*.

No cervídeo com *Theileria cervi* foram identificados nove *Rhipicephalus microplus*. Essa é a espécie de carrapato mais importante economicamente e que acomete grandes ruminantes no Brasil e em outros países, sendo espécie que foi introduzida no Brasil (CANÇADO et al, 2009), e é vetor exclusivo de piroplasmas, causadores de babesiose bovina (*B. bovis* e *B. bigemina*) no Brasil (BILHASSI et al., 2014). Em estudo de Silveira et al (2011) a maioria dos veados de espécie *M. gouazoubira* (veado catingueiro), positivos para *T. cervi*, estavam infestados com *R. microplus*. Porém, ainda não há evidências na literatura que comprovem que esta espécie possui relação com a transmissão de *T. cervi* em cervídeos brasileiros.

A irara deste estudo, a qual se identificou sequência similar à *Hepatozoon felis*, apresentava um espécime de carrapato *Amblyomma ovale*, relatado como possível vetor de *Hepatozoon* sp. no Brasil (FORLANO et al, 2005). Isso foi um resultado importante, pois esse pode ser o transmissor de *H. canis* no carnívoro do trabalho.

7 CONCLUSÃO

- ❖ Não se observou *Hepatozoon* spp. nas extensões sanguíneas dos mamíferos silvestres;
- ❖ Pela PCR, observou-se prevalências de 5,2% para *Hepatozoon* spp. e 26,3% para Piroplasmida;
- ❖ Os *primers* HepF300 e Hep900 foram inespecíficos para detecção de hemoparasitos do gênero *Hepatozoon*;
- ❖ Foram observados parasitos da ordem Piroplasmida na maioria das ordens dos animais, utilizando microscopia óptica;
- ❖ Foram obtidas novas sequências de *Hepatozoon canis* em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e em raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), e *Hepatozoon felis* em onça-parda e em irara (*Eira barbara*); *Theileria cervi* em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), *Cytauxzoon felis* em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e *Theileria equi* em anta (*Tapirus terrestris*);
- ❖ Várias espécies de carrapatos estavam presentes na maioria dos animais de vida livre;
- ❖ Os principais carrapatos observados foram espécies específicas sendo *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dubidatum* e *Rhipicephalus microplus*.
- ❖ Observou-se, nas extensões sanguíneas, outros hemoparasitos tais como *Ehrlichia* spp. e microfilárias.

8 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Publicación Científica y Técnica**, no. 580. 2. ed. Washington: OPS/ OMS, 1986.

ADL, S. M. et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399 – 451, set. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>

AKTAS, M. et al. A molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 264-267 fev. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.015>

ALLAN, S.A. Ticks (Class Arachnida: Ordem Acarina).72-106 p. Em: SAMUEL, W.M.; PYBS, M.J.; KOCAN, A.A. **Parasitic Diseases of Wild Mammals**. Iowa, Ed. University Press. 2001.

ALLEN, K. E. et al. Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. **The Journal of Parasitology**, vol. 97, n. 4, p. 648-653, agosto, 2011. <https://doi.org/10.1645/GE-2672.1>

ALMEIDA, A. P. et al. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks Tick Borne Disease**, v. 3, n.4, p. 203- 206, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 640-646, maio, 2013. <https://doi.org/10.1603/ME12272>

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p. 80-87

ANDERSON, R.C. The superfamily Filarioidea. Em: ANDERSON, R.C. **Nematode Parasites of Vertebrates; Their Development and Transmission**. 2ª ed. Nova York, Cabi Publishing Ed. 2000.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular Detection of *Cytauxzoon* spp. in Asymptomatic Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 234-237, jan. 2009. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.234>

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017–1023, jul. 2010. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.1017>

ANDRÉ, M. R. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 134–138, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.014>

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in Brazilian zoos. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**. v. 42, n. 1, p. 139-143. 2011. <https://doi.org/10.1638/2010-0074.1>

ANDRÉ, M. R. et al. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** (2014). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>. Acesso em: 02 set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 31, n. 4, p. 759- 843. out. 1936. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761936000400004>

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 623-632 set. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752005000300015>. Acesso em: 10 set. 2017. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000300015>

AYALA, S. C., A. D'ALESSANDRO, R. MACKENZIE, AND D. ANGEL. Hemoparasite infection in 830 wild mammals from the eastern llanos of Colombia. **Journal of Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 52-59, fev. 1973. <https://doi.org/10.2307/3278571>

BANETH, G.; MATHEWS, J. S.; SHKAP, V.; Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 27-31 jan. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00016-8)

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 283-299, abr. 2007. <https://doi.org/10.1645/GE-494R.1>

BANETH, G., et al. Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa:Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 102, p. 1-10, 2013.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 11, n. 6, p. 365-376, dez. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00482.x>

BANETH, G: Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 3-11, p. 2011.

BARBOSA, C. B. F.; SANCHES, L. A. FREIRE, M. R. Zoonoses transmitidas por animais silvestres oriundos do tráfico. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 9 2014.

BARBOSA, A. et al. Prevalence, genetic diversity and potential clinical impact of blood-borne and enteric protozoan parasites in native mammals from northern Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 238, p. 94-105, abr. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.007>. Acesso em 20 set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.007>

BARROS-BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância medico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para**

identificação de espécies. São Paulo: Editora ICTTD-3/Instituto Butantan, 2006.

BARTA, J. R.; OGEDENGBE, J. D.; MARTIN, D. S.; SMITH, T. G. Phylogenetic Position of the Adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) Inferred Using 18S rDNA Sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x>

BATTSETSEG, B. et al. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 351-357, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00131-0)

BECHARA, G. H. et al. Ticks associated with Armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) of Emas National Park, State of Goias, Brazil. **New York Academy of Sciences**, vol 969, 290-293 p. 2002.

BECK, A. et al. The prevalence and impact of *Babesia canis* and *Theileria* sp. in free-ranging grey wolf (*Canis lupus*) populations in Croatia. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 168, p. 2 - 9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2106-8>

BELONTINDOS, L. P.; LAZARO, J. V.; VILLANUEVA, M. A.; MINGALA, C. N. Molecular detection and characterization of *Theileria* species in the Philippines. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 3, p. 448–453, 2014.

BHOORA, R.; FRANSSEN, L.; OOSTHUIZEN, M.; GUTHRIE, A. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 112-120, out. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.004>

BILHASSI, T. B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.002>. Acesso em: 02 nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.002>

BISHOP, R. et al. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 271–283, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004748>

BITENCOURTH, K. et al. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**. 2016. DOI: 10.1111/mve.12174 2016. <https://doi.org/10.1111/mve.12174>

BLOUIN, E.F.; KOCAN, A.A.; GLENN, B. L.; KOCAN, K. M; HAIR, J. A.. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 3, p. 241–242, 1984. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-20.3.241>

BROWN, H. M. et al. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 311-316, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.041>

CANÇADO, P. H. D et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Central Pantanal of

Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n.1, p. 42-46, mar. 2009. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01801008>

CARDOSO, L. et al. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 90–95, jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.060>

CARLI, E et al. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. **Vet. Parasitology**, v. 183, p. 343-352, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.025>

CARPENTER, J. W. **Formulário de Animais Exóticos**. 3ª Ed. São Paulo: Editora MedVet, 2010.

CHANG, C.; KASTEN, R. W.; CHOMEL, B. B. Coyotes as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp *berkhoffii* infection in coyotes from central costal California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4193-4200, 2000.

CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F. Wildlife, Exotic Pets and Emerging Zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 23-25, jan. 2007. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060480>

CHRISTOPHERS, S. R. The sexual life cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Sci Mem Off Med Sanit Dep Gov India**, v. 28, p. 1–11, 1907.

COLLET, M. G. Survey of canine babesiosis in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n.3, p. 180-186, set. 2000. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.710>

CONCEIÇÃO-SILVA, P. et al. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 2, p. 344-347, 1988. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-24.2.344>

CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. **Wild animals and public health. Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Editora M. E. Fowler. Iowa: Editora M. E. Fowler. 2001.

CRAIG, T. M.; SMALLWOOD, J. E.; KNAUER, K. W.; MCGRATH, J. P. Hepatozoon canis infection in dogs: clinical, radiographic and hematologic findings. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 8, p. 967-972, 1978.

CRIADO-FORNÉLIO, A. et al. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 3, p. 187–193, 2009. <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0031-5>

CRIADO-FORNÉLIO, A et al. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 261–269, 2007.

CRIADO-FORNÉLIO, A. et al. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93–99, fev. 2006. <https://doi.org/10.1645/GE-464R.1>

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**

– Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2006. 1354 p.

CUBAS, Z. Z. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.15, 267-287. 1996. <https://doi.org/10.20506/rst.15.1.918>

DASZAK, P., CUNNINGHAM, A.A., HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. **Science Compass**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, jan. 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

DAVIS, L. J. On a piroplasm of the Sudanese wild cat (*Felis ocreata*). *Trans. R. Soc. Tropical Medicine and Hygiene*, v. 22, n. 6, 523–534 p., abr. 1929.

DEMONER, L. C.; et al. *Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 859–864, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.002>

DENNIG, H. K.; BROCKLESBY, D. W. *Babesia pantherae* new species, a piroplasm of the leopard *Panthera pardus*. **Parasitology**, v. 64, n.3, p. 525–532, 1972. <https://doi.org/10.1017/S0031182000045595>

DEZDEK, D. et al. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 333–336 jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.022>

DISSANAIKE, A. S. On some blood parasites of wild animals in Ceylon. **Ceylon Veterinary Journal**, v. 11, n. 3, p. 73-86. 1963.

DOBSON, A.; FOUFOPOULOS, J. Emerging infectious pathogens of wildlife. **Philosophical Transactions : Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p.1001-1012, jul. 2001. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0900>

DUARTE, J. M. B. Saude populacional em cervideos, o desafio da Medicina da Conservação. Em: One World-One Health: Brazil– Symposium Healthy Ecosystems, Livestock and Human Livelihoods: An Innovative Public–Private Partnership. 2007. Disponível em: <http://www.oneworldonehealth.org/oct2007/presentations/duarte.html>. Acesso em: 18 set. 2017.

DUSCHER, G. G.; FUEHRER, H.; KUBBER-HEISS, A. Fox on the run – molecular surveillance of Fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 521, p. 1-7, 2014.

DUSCHER, G. G.; KUBBER-HEISS, A.; RICHTER, B.; SUCHENTRUNK, F. A golden jackal (*Canis aureus*) from Austria bearing *Hepatozoon canis*– import due to immigration into a non-endemic area? **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1-2, p. 133– 137, jan 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.040>

EMERSON, H. R.; WRIGHT, W. T. Correction. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 5, n. 519, 1970.

ESTRADA-PENÑA, A., et al. E. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 4, p. 387–397, dez. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00523.x>

EWING, S. A.; PANCIERA, R. J. American canine hepatozoonosis. **Clinical**

Microbiology Reviews, v. 16, n. 4, p. 688–697, 2003.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.688-697.2003>

EWING, S.A.; BUCKNER, R. G. STRINGER, B. G. The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia sp.* **The Journal of Parasitology**, Local, v. 50, n. 5, p. 704,, out. 1964.

FARKAS, R., et al. First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. **Parasite and Vectors**, v. 7, n. 303, p. 1 – 7, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-303>

FARKAS, R. et al. First report on *Babesia cf. microti* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Hungary. **Parasite and Vectors**, v. 5, n. 5, p. 1-6, jan. 2015.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0660-5>

FILONI, C.; et al. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470–477, abr. 2006. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.470>

FILONI, C. et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropic and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 66–173, jul. 2012.
<https://doi.org/10.1177/1040638711407684>

FOLVARI, G. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.1-2, p. 125-131, abr.2005.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.032>

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

FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993.

FREDO G., et al. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 51, n. 4, p. 880-884, out. 2015.
<https://doi.org/10.7589/2014-12-283>

FURTADO, M. M. et al. *Hepatozoon* spp. Infect Free-Ranging Jaguars (*Panthera onca*) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 243-250, jun. 2017.
<https://doi.org/10.1645/16-99>

FURTADO, M. M., et al. Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brasil? **Ticks and Tick-borne diseases**, v. 8, n.4, p. 470-476, jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.005>

GABRIELLI, S. et al. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 9, p. 855– 859, nov. 2010. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0182>

GARCIA, M. V., et al Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 124-128, jan.-mar. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100023>

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

GREENE, C. E.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. **Cytauxzoonosis**. 2006. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Editora Saunders Elsevier. 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region**. Atlanta: Editora Universiteit Utrecht, J. Bovy- Verbeek. 173 p. 2003.

GUGLIELMONE, A. A., et al. **The Hard Ticks of the World** (Acari: Ixodida: Ixodidae). Holanda: Editora Springer. 2014.

GUIMARÃES, J. H., TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001.

HODZIC, A.; ALIC, A.; FUEHRER, H.; HARL, J.; WILLE-PIAZZAI, W.; DUSCHER, G. G. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 88, p. 1-7,2015.

HOLMAN, P. J.; CARROLL, J. E.; PUGH, R.; DAVIS, D. S. Molecular detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Tom Green County in Central Texas. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3-4, p. 298–304, maio, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.052>

HOLMAN, P. J.; SNOWDEN, K. F. Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and Feline Cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1035-1053, nov. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.08.002>

HOLMAN, P. J.; WALDRUP, K. A.; DROLESKEY, R. E.; CORRIER, D. E.; WAGNER, G. G. In vitro growth of *Babesia bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) erythrocytes. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 233–237, abr. 1993. <https://doi.org/10.2307/3283513>

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451-469, jul. 2000. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>

HOOVER, J. P.; WALKER, D. B.; HEDGES, J. D. Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985–1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 205, n. 3, p. 455–460, agost. 1994.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L. & KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 27-54, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1025381712339>

HUNFELD, K.; HILDEBRANDTS, A.; GRAY, J. Babesiosis: Recent insights into na

ancient disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219-1237, set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>

INCI, A., et al. Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. **Parasitology Research**, v. 101, n.2, p. 273–279, set. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS- IBAMA 2005. **Biomass Brasileiros**. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 22 set. 2017.

IVANOV, A.; TSACHEV, I. *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. **Trakia Journal of Sciences**, v. 6, n. 2, p. 27-35, 2008.

JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 126-139, maio, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.047>

JANG, S.; CHO, K.; CHAE, J. S.; KANG, S. H. Fast diagnosis of bovine theileriosis by whole blood PCR and microchip electrophoresis. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v, 25, n. 5, 757–760, maio, 2003.

JOHNSON, E. M.; ALLEN, K. E.; PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; LITTLE, S. E. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 162-166, out. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.028>

JOHNSON, E. M.; ALLEN, K. E.; PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; LITTLE, S. E.; REICHARD, M. V. Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 27–32, nov 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.050>

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS, J. E.; KOHLS, G. M. Ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western hemisphere. Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series, vol. 17, n. 4, Artigo 1. 1972. Disponível em: <http://scholarsarchive.byu.edu/byuscib/vol17/iss4/1>. Acesso em: 16 set. 2017.

JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; JÚNIOR, J. A. M.; MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 686-710, set. 2010. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1403.06>

KAWABUCHI, T. et al. *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captures in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 8, p. 825-827, agost. 2005.

KHUKHUU, A., et al. Molecular epidemiological survey of *Theileria orientalis* in Thua Thien Hue Province, Vietnam. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 5, p. 701–705, maio, 2010. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0472>

KIER, A. B. **The etiology and pathogenesis of feline cytauxzoonosis**. 1979. 482 p. Dissertação de mestrado – Universidade de Missouri, Columbia, 1979. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(87\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(87)90020-X)

- KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; KINDEN, D. A. The pathology of experimental cytauxzoonosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 97, n. 4, p. 415–432, jul. 1987.
- KIVARIA, F. M.; RUHETA, M. R.; MKONYI, P. A.; MALAMSHA, P. C. Epidemiological aspects and economic impact of bovine theileriosis (East Coast fever) and its control: A preliminary assessment with special reference to Kibaha district, Tanzania. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p. 384–390, mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.08.013>
- KOCAN, A.; KOCAN, K. M. Tick-transmitted protozoan diseases of wildlife in North America. **Bul. Society for Vector Ecologists**, v. 16, p. 94–108, 1991.
- KUBO, M. et al. Parasitological and molecular features of the *Hepatozoon* species in the myocardium of Japanese Martens (*Martes melampus melampus*). **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 6, p. 1496-502. Dez. 2009.
- KUBO, M. et al. *Hepatozoon ursi* n. sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). **Parasitology International**, v. 57, n. 3, p. 287–294, set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.002>
- LABRUNA, M. B. et al. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group Rickettsia Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, vol. 41, n. 3, p. 533-537.2004.
- LABRUNA, M. B., et al. Ticks (Acari:Ixodida) on Wild Carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n. 1-2, p. 149-163, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-2563-1>
- LAHA, R.; DAS, M.; SEN, A. Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. **Tropical Parasitology**, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2015. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162490>
- LECLAIRE, S.; MENARD, S.; BERRY, A. Molecular characterization of *Babesia* and *Cytauxzoon* species in wild South-African meerkats. **Parasitology**, v. 142, n. 4, p. 543-548, abr.2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001504>
- LEMPEREUR, L. et al. Guidelines for detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 51-65, jan. 2017. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1955>
- LEVINE, N. D., et al. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, fev. 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>
- LEWIS, K. M.; COHN, L. A. BIRKENHEUER, A. J. Lack of evidence for perinatal of *Cytauxzoon felis* in domestic cats. **Veterinary Parasitology** v. 188, n. 1-2, 172-174, agost. 2012.
- MACHADO, R. Z.; MULLER, E. Frequência de anticorpos contra *Babesia* em Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal e no Parque das Emas. In: DUARTE, J. M. B. **Relatório Final de Pesquisas do Projeto Veado-campeiro** (*Ozotocerus bezoarticus*)., Brasília: FNMA, 1996. p. 124–132
- MACINTIRE, D. K.; VINCENT-JOHNSON, N. A.; CRAIG, T. M. *Hepatozoon*

americanum infection, In: Greene CE. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Editora Saunders Elsevier, 2006.

MACINTIRE, D. K. et al. Treatment of dogs infected with *Hepatozoon americanum*: 53 cases (1989–1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 1, p. 77–82, jan. 2001. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.77>

MAFRA, C. et. al. Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus *Callithrix*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n.1, p. 78 - 81, Jan./Mar. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015001>

MAIA, J. P.; ÁLVARES, F.; BORATYNSKI, Z.; BRITO, J. C. Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 4, p. 837-848, out. 2014. <https://doi.org/10.7589/2013-10-280>

MAIA, N.L. **Identificação e caracterização de bioagentes da ordem Rickettsiales veiculados por carrapatos e pulgas em animais recebidos no centro de triagem de animais silvestres (CETAS) da Universidade Federal de Viçosa, estado de Minas Gerais**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em *Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75–99, jun. 2010.

MARTINS, T. F.; et al. New ticks records from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 62, n. 1, p 121-128, jan. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9724-4>

MATHEW, J. S.; EWING, S. A.; PANCIERA, R. J.; WOODS, J. P. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 1- 14,dez. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00189-7)

MATJILA, P. T.; JONGEJAN, F.; BERTSCHINGER, H. J.; PENSZHORN, B. L. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycan pictus*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n.1-2, p. 123-127, out. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.016>

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467–475 jun. 1998. <https://doi.org/10.1007/s004360050431>

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103,1984. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60285-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60285-7)

MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. A. Feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 1, p. 89–101,2005. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.003>

- METZGER, B. et al. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 28–33, mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.006>
- MILLÁN, J. et al. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. **Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 995–1001, jul. 2007. <https://doi.org/10.1017/S003118200700248X>
- MIRANDA, R. L. et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 392–396, maio, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.044>
- MIRANDA, R. L. et al. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 326–329, out. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.015>
- MITKOVÁ, B., et al. Autochthonous Hepatozoon infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic. **Parasitology Research**, v. 115, n. 11, p. 4176-4171, nov. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5191-2>
- MITKOVÁ, B.; QABLAN, M. A.; MIHALCA, A. D.; MODRY, D. Questing for the identity of *Hepatozoon* in foxes. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1., p. 1 - 6, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-S1-O23>
- MODRÝ, D.; BECK, R.; HRAZDILOVA, K.; BANETH, G. A Review of Methods for Detection of *Hepatozoon* Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 66-72, jan. 2017. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1963>
- MURATA, T., et al. Detection of *Hepatozoon canis* oocysts from ticks collected from the infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 111- 112 fev.1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.111>
- MURATA, T., et al. Vertical Transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 867-868, out.1993. <https://doi.org/10.1292/jvms.55.867>
- NAJM, N.; MEYER-KAYSER, E.; HOFFMANN, L.; PFISTER, K.; SILAGHI, C. *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2679–2685,, jul. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3923-8>
- NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CACERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1987) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
- NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n.1, p. 2857-2877, jan. 2009. <https://doi.org/10.2741/3418>

NIETFELD, J.C.; POLLOCK, C. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p. 607–610, jul. 2002. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.3.607>

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143–150, jan. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00378-2)

O'DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y.; KOHAYAGAWA, A. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo State, Brazil. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 240–242, out. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1190-9>

OOSTHUIZEN, M. C.; ALLSOPP, B. A.; TROSKIE, M.; COLLINS, N. E.; PENZHORN, B. L. Identification of novel *Babesia* and *Theileria* species in South African giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Linnaeus, 1758) and roan antelope (*Hippotragus equinus*, Desmarest 1804). **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 39–46, jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.045>

OOSTHUIZEN, M. C., et al. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). **Journal of Clinical Microbiology** v. 46, n.7, p. 2247–2251, jul. 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.00167-08>

OTRANTO, D, et al. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part I: Protozoa and tick-borne agents. **Veterinary Parasitology**, v. 213, n. 1-2, p. 12-23, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.022>

PAGLIA, A. P.; CHIARELLO, A. G.; DE MELO, F. R.; TAVARES V.; RODRIGUES, F. **Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais** - Subsídio ao Programa BIOTA MINAS- Mamíferos. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009. 624 p.

PAGLIA, A. P. et al. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil, 2012. 76 p.

PANCIERA, R. J.; MATHEW, J. S.; EWING, S. A. Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 225–230, maio, 2000. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-225>

PARAENSE, W. L.; VIANNA, Y. L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 13, p. 595-603, set. 1948.

PARK, S., et al. Coinfection with *Hepatozoon* sp. and Canine Distemper Virus in a Yellow-throated Marten (*Martes flavigula koreana*) in Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 414–417, abr. 2016. <https://doi.org/10.7589/2015-04-086>

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world.: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 18, n. 4, p.719-756, out. 2005. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>

PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C. D. FRANÇA, T. N.; BARROS, S. S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary**

Parasitology, v. 145, n. 3-4, p. 383–387, abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.023>

PENZHORN, B. L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 11-21, maio, 2006.

PENZHORN, B. L.; KJEMTRUP, A. E.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; CONRAD, P. A. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 681–685, jun. 2001. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0681:BLNSFL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0681:BLNSFL]2.0.CO;2)

PENZHORN, Barend L. et al. Black-backed jackals (*Canis mesomelas*) are natural hosts of *Babesia rossi*, the virulent causative agent of canine babesiosis in sub-Saharan Africa. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 124, p. 1 - 6, 2017.

PEREIRA, M. C.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M. B.; RECHAV, Y. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 979-983, nov. 2000. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.6.979>

POTTER, T. M.; MACINTIRE, D. K. *Hepatozoon americanum*: an emerging disease in the south-central/southeastern United States. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 70–76, fev. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00508.x>

REAGAN, W. J.; ROVIRA, A. R. I.; DENICOLA, D. B. **Atlas de Hematologia Veterinária**- Espécies domésticas e não domésticas comuns. 2. ed. Rio de Janeiro- RJ: Revinter, 108 p. 721. 2011. 721 p.

REICHARD, M. V.; EDWARDS, A. C.; MEINKOTH, J. H.; SNIDER, T. A.; MEINKOTH, K. R.; HEINZ, R. E.; LITTLE, S. E. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 890–896, set. 2010. <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.5.890>

REYE, A. L.; HUBSCHEN, J. M.; SAUSY, A.; MULLER, C. P. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2923–2931, maio, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.03061-09>

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; MASSARD, C. L. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procyonid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 347–350, jan. 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0268-y>

ROTSTEIN, D. S.; TAYLOR, S. K.; HARVEY, J. W.; BEAN, J. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 3, p. 607–613, jul. 1999. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.3.613>

SAKUMA, M., et al. A case report: a dog with acute onset of *Hepatozoon canis* infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p. 835–838, jun. 2009. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.835>

SALAKIJ, C., et al. Hematologic, cytochemical, ultrastructural, and molecular findings of *Hepatozoon* infected flat-headed cats (*Prionailurus planiceps*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 31–41, mar. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00011.x>

SARAIVA, D.G, et al, Ticks (Acari Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159–166, out. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9570-9>

SCOLES, G. A.; UETI, M. W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1 - 9, out. 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-306>

SHKAP, V.; BANETH, G.; PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by imunofluorescence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 1, p. 121-123 p., jan. 1994.

SIDDALL, M.E. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 116-125, abr. 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01551.x>

SIKES, R.; GANNON, W. L. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 235–253, 2011. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>

SILVA, J. C. R. OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 217-224, dez. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00523-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00523-4)

SILVA, M. R. L. da, et al. Didelphis albiventris naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne diseases**. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>. Acesso em: 08 set, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>

SILVEIRA, A. W. ; DE OLIVEIRA, G. G.; SANTOS, L. M.; AZUAGA, L. B. S.; COUTINHO, C. R. M.; ECHEVERRIA, J. ANTUNES, T. R.; RAMOS, C. R. N.; DE SOUZA, A. I. Natural Infection of the South American Tapir (*Tapirus terrestris*) by *Theileria equi*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 2, p. 1-3, abr. 2017. <https://doi.org/10.7589/2016-06-149>

SILVEIRA, J. A. G. et al . Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 206-215, abr.-jun. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014035>

SILVEIRA, J. A. G., et al. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 4, n. 4, p. 341-345, jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.008>

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus*

dichotomus) in the State of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitol**, v. 177, n. 1-2, p. 61-66, abr.2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.044>

SIMPSON, V. R., et al. Myocarditis and myositis due to infection with *Hepatozoon* species in pine martens (*Martes martes*) in Scotland. **Veterinary Record**, v. 156, n.14, p. 442-446, abr. 2005. <https://doi.org/10.1136/vr.156.14.442>

SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOV, J.; VOTYPKA, J.; MODRY, D. Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 13-16, mar. 2008. <https://doi.org/10.14411/fp.2008.003>

SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **The Journal of Parasitology**, v.82, n. 4, p. 565–585, agost. 1996.

SOARES, H. S., et al. Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 2, p. 115-121, agost. 2017.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. Londres: Editora: Baillière Tindall, 1982.

SOUZA, K. C. M. de. et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 237-246, fev 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.023>. Acesso em: 05 set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.023>

SPOLIDORIO, M. G., et al. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357-361, agost. 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 253-255, jul.-set. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300015>

TAMPIERI, M. P., et al. Wild Ungulates as *Babesia* Hosts in Northern and Central Italy. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 8, n. 5, p. 667-674, out. 2008. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0001>

TELFORD JR., S. R. Three new *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 162–169, fev.2010. <https://doi.org/10.1645/GE-2161.1>

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, p. 2015.

THOISY, B. de; MICHEL, J.; VOGEL, I.; VIÉ, J. A Survey of Hemoparasite Infections in Free-Ranging Mammals and Reptiles in French Guiana. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5. p. 1035-1040, out. 2000. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1035:ASOHII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1035:ASOHII]2.0.CO;2)

- UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, maio, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n.1-3, p. 19-41, mar.1995. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03107-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03107-8)
- UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High Prevalence of *Hepatozoon* Spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670-672, jun. 2004. <https://doi.org/10.1645/GE-204R>
- VAN VUUREN, M.; PENZHORN, B.L. Geographic range of vector-borne infections and their vectors: the role of African wildlife. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 1, p. 139-149, abr. 2015. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2350>
- VERONESI, F., et al. First detection of *Cytauxzoon* spp. infection in European wildcats (*Felis silvestris silvestris*) of Italy. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 853-858, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.003>
- VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. Belo Horizonte: Editora CEM, 2003. 320 p.
- VINCENT-JOHNSON, N. A., et al. A New *Hepatozoon* Species from Dogs: Description of the Causative Agent of Canine Hepatozoonosis in North America. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1165-1172, dez.1997. <https://doi.org/10.2307/3284379>
- WAGNER, J. E. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 68, n. 7, p. 585-588, abr. 1976.
- WAGNER, J. E. Cytauxzoonosis in domestic cats (*Felis domestica*) in Missouri. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, n. 874, 1975.
- WANG, G., et al. Comparison of a quantitative PCR assay with peripheral blood smear examination for detection and quantitation of *Babesia microti* infection in humans. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 82, n. 2, p. 109-113, jun. 2015.
- WIDMER, E. C. **Perfil sanitário de onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre no Pantanal sul do Mato Grosso do Sul – Brasil**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado) para obtenção do título de Mestre em Ciências. Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- WIGHTMAN, S. R.; KIER, A. B., WAGNER, J. E. Feline cytauxzoonosis: clinical features of a newly described blood parasite disease. **Feline Practice Journal**, v. 7, n. 3, p. 23–26, 1997.
- WOLF, R. W., et al. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting nonvolant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n.3, p. 449-456, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.005>
- YABSLEY, M. J.; QUICK, T. C.; LITTLE, S. E. Theileriosis in a white-tailed deer

(*Odocoileus virginianus*) fawn. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 806-809, out. 2005. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.806>

YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. Natural history of zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 22, n. 2, p. 18-31, nov. 2013.

ZANET, S., et al. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. **Parasite and Vectors**, v. 17, n. 7, p. 1 - 7, fev. 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-70>

ANEXO A - Termos de Concessão do Estudo



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52561-2	Data da Emissão: 13/10/2016 10:54	Data para Revalidação*: 12/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Talita Silva Alves	CPF: 100.068.166-14
Título do Projeto: Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos em mamíferos de ambientes cativos	
Nome da Instituição : Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Leitura das lâminas	05/2016	11/2016
2	Coleta de material sanguíneo e ectoparasito e confecção de lâminas em mamíferos de ambientes cativos	07/2016	10/2016
3	Identificação dos ectoparasitos	11/2016	12/2016
4	Realização da PCR	12/2016	06/2017
5	Análise dos resultados	07/2017	08/2017
6	Finalização do curso de mestrado com defesa da dissertação	08/2017	10/2017

1 As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.

2 Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

3 Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.

4 A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).

5 O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

6 O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

7 Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.

8 Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ELISETE DE ARAUJO NAVES	Médica Veterinária no Zoológico de Uberlândia	999.712.836-20	5831433 ssp-MG	Brasileira
2	MARCIA CRISTINA CURY	Orientadora do projeto	857.540.216-15	-	Brasileira
3	André Luiz Quagliatto Santos	Pesquisador supervisor de coletas do LAPAS- MG	028.478.228-95	8334281 SSP-SP	Brasileira

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ELISETE DE ARAUJO NAVES	Médica Veterinária no Zoológico de Uberlândia	999.712.836-20	5831433 ssp-MG	Brasileira
2	MARCIA CRISTINA CURY	Orientadora do projeto	857.540.216-15	-	Brasileira
3	André Luiz Quagliatto Santos	Pesquisador supervisor de coletas do LAPAS- MG	028.478.228-95	8334281 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	UBERLANDIA	MG	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11553741





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52561-2	Data da Emissão: 13/10/2016 10:54	Data para Revalidação*: 12/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Talita Silva Alves	CPF: 100.068.166-14
Título do Projeto: Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos em mamíferos de ambientes cativos	
Nome da Instituição : Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

2	UBERLANDIA	MG	Zoológico Municipal Parque do Sabiá	Fora de UC Federal
---	------------	----	-------------------------------------	--------------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Puma yagouaroundi, Chrysocyon brachyurus, Panthera onca, Hydrochoerus hydrochaeris, Didelphis albiventris, Cerdocyon thous, Conepatus semistriatus, Callithrix penicillata, Procyon cancrivorus, Nasua nasua, Sapajus apella, Mazama gouazoubira, Myrmecophaga tridactyla, Tamandua tetradactyla, Alouatta caraya, Puma concolor, Eira barbara, Leopardus pardalis, Coendou prehensilis, Ixodidae, Pseudalopex vetulus

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Ectoparasita, Sangue
2	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Ectoparasita
4	Amostras biológicas (Primates)	Ectoparasita, Sangue
5	Amostras biológicas (Tamanduás)	Sangue, Ectoparasita
6	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal de Uberlândia	
2	Universidade Federal de Uberlândia	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11553741



Página 2/3



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 205/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 036/16

Projeto Pesquisa: “Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos de mamíferos em ambientes cativos”.

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: SOLICITAÇÃO DE ADENDO APROVADA.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 03 de outubro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU



SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS
CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES – CETAS

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 017	Data da emissão: 24/02/2016
DADOS DO TITULAR	
Nome: Talita Silva Alves	CI/CPF: MG-14.120.620 / 100.068.166-14
Título do projeto: "Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos em mamíferos de ambientes cativos".	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia – Minas Gerais	

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES – 2015/2016			
	Descrição de atividades	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento/Atualização Bibliográfica	1º trimestre de 2015	4º trimestre de 2016
2	Submissão do Projeto ao CEUA e SISBI	3º trimestre de 2015	-----
3	Coleta de sangue dos mamíferos cativos	3º trimestre de 2015	4º trimestre de 2016
4	Elaboração das extensões sanguíneas	4º trimestre de 2015	4º trimestre de 2016
5	Processamento das extensões	4º trimestre de 2015	4º trimestre de 2016
6	Elaboração da PCR	4º trimestre de 2015	4º trimestre de 2016
7	Sequenciamento	2º trimestre de 2016	4º trimestre de 2016
8	Organização dos dados	2º trimestre de 2016	4º trimestre de 2016
9	Análise estatística	3º trimestre de 2016	4º trimestre de 2016
10	Elaboração do relatório final e artigos	4º trimestre de 2016	-----

De acordo com o art. 15 da Portaria IEF 148/2013, esta autorização tem prazo de validade de um ano, mas caso haja destinação para o animal que está sendo pesquisado, o mesmo só ficará à disposição do pesquisador até a data prevista da destinação.

OBSERVAÇÕES E RESSALVAS	
1	Esta autorização é um ato discricionário e não gera obrigatoriedade no fornecimento das amostras ao pesquisador.
2	Esta autorização NÃO garante exclusividade do fornecimento das amostras ao pesquisador, podendo as amostras serem direcionadas a outras pesquisas quando houver interesse da Administração Pública.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Portaria IEF 148/2013, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio – menu Exportação.
5	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.

A. Bice



SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
 INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS
 CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES – CETAS

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 017		Data da emissão: 24/02/2016			
EQUIPE					
	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Talita Silva Alves	Pesquisadora	100.068.166-14	MG-14.120.620	Brasileira

LOCAIS ONDE AS ATIVIDADES DE CAMPO SERÃO EXECUTADAS

	Município	UF	Descrição do Local	Tipo
1	Belo Horizonte	Minas Gerais	CETAS/BH	Coleta

ATIVIDADES x TÁXONS

	Atividades	Táxons
1	Coleta de sangue com treinamento da equipe CETAS para a coleta das amostras, sob supervisão do responsável pelo CETAS.	Mamíferos silvestres
2	Armazenamento das amostras – as amostras de sangue serão aproveitadas de todos os mamíferos silvestres de qualquer sexo, idade ou espécie submetidos à manejo de contenção física ou química por motivos de qualquer natureza, tendo ou não qualquer natureza, tendo ou não qualquer alteração clínica.	
3	Coleta de sangue de ponta de orelha de cada animal, com lanceta.	
4	Coleta e identificação dos carrapatos;	
5	Caracterização Molecular – Extração de DNA a partir das amostras de sangue; Amplificação – fragmentos dos genes dos espécimes;	
6	Eletroforese – os produtos das reações serão submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1X.	
7	Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento;	
8	Sequenciamento, avaliação, edição e alinhamento;	
9	Análise estatística – para estimar a positividade dos indivíduos à infecção pelos hemoparasitos-alvos do estudo, será utilizado o intervalo de confiança para a proporção. Será relacionado a positividade com a espécie e sexo do mamífero, utilizando o teste de qui-quadrado para independência. Também será comparado a positividade entre os tipos de animais, utilizando o teste da binomial para duas proporções.	



MATERIAIS E MÉTODOS	
1	Para validação do estudo utilizando amostras oriundas de animais silvestres, o projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia e será submetido ao SISBIO.
2	CETAS/BH – As coletas de sangue serão executadas por médicos veterinários dos CETAS. Haverá participação de médicos veterinários residentes do LAPAS, que farão as primeiras coletas e treinarão a equipe dos CETAS para coleta de amostras para o presente trabalho. As coletas serão realizadas sob autorização e supervisão do biólogo ou médico veterinário responsável nos CETAS.
3	Os procedimentos de captura e manipulação dos animais seguirão as recomendações do guia da Sociedade Americana de Mastozoologia para uso de mamíferos selvagens em pesquisa e do guia de tratamento de animais em pesquisa..
4	As amostras de sangue serão aproveitadas de todos os mamíferos silvestres de qualquer sexo, idade ou espécie submetidos à manejo de contenção física ou química por motivos de qualquer natureza, tendo ou não qualquer alteração clínica. A coleta de sangue será realizada pela punção da veia cefálica, jugular dos mamíferos silvestres pelo modo à vácuo, utilizando agulha Vacutainer, ou quando necessário utilizando seringa 5 ou 3 ml e agulhas descartáveis, dependendo do porte do animal. O volume sanguíneo respeitará o tamanho do animal. As amostras de sangue serão colocadas em tubos Vacutainer com anticoagulante que será armazenado a – 20º.
5	Após a coleta o esfregaço sanguíneo deverá ser realizado até 12 horas. Serão realizadas de dois à quatro esfregaços sanguíneos de cada animal.
	O restante do sangue no tubo contendo EDTA deve ser congelado, até ser encaminhado a Universidade Federal de Uberlândia em caixa térmica contendo gelox. Com esta amostra será realizada a técnica molecular PCR.
6	Também deve ser feito a coleta de sangue de ponta de orelha de cada animal. O sangue de ponta de orelha será coletado apenas para a confecção de esfregaço sanguíneo, para que seja possível realizar a verificação de ocorrência de hemoparasitas sob microscopia óptica. Será utilizado lanceta.
7	Para coloração será utilizado o kit comercial Panótico Rápido LB.
8	Coleta e Identificação dos carrapatos: A coleta será realizada de forma manual e aleatória em relação à região do corpo onde os ectoparasitas forem encontrados. A taxonômica em nível de espécie dos ectoparasitos será realizada segundo Martins et al. (2010).
9	O DNA dos hemoparasitas do estudo será extraído a partir das amostras de sangue.
10	Para amplificação de fragmentos dos genes de espécimes do gênero <i>Rickettsia</i> , as reações acontecerão de acordo com Labruna et al., (2004). Em relação ao gênero <i>Ehrlichia</i> , de acordo com Inokuma et al., (2002). Para os gêneros <i>Babesia</i> e <i>Hepatozoon</i> de acordo com Spolidorio et al., (2009).
11	Os produtos das reações serão submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1X. As amostras livres de DNA serão incluídas em todas as reações com controle negativo de contaminação.
12	Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento – As reações de sequenciamento serão realizadas, utilizando-se o reagente <i>BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit</i> e sequenciadas em analisador de ácidos nucleicos ABI 3130.
13	Sequenciamento, avaliação, edição e alinhamento – Avaliação de cromatogramas das sequências, sequências de nucleotídeos de cada amostra amplificada e análise filogenética.

to Brie



SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
 INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS
 CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES – CETAS

Destino do Material Biológico Coletado

	Nome do local de destino
1	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia Minas Gerais

REGISTRO DE COLETA IMPREVISTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 017	Data da emissão: 24/02/2016
-------------	-----------------------------

Érika Procópio
 Érika Procópio Tostes Teixeira
 Analista Ambiental ERCS/IEF
 MASP 1.343.614-2



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
 Superintendência do Ibama no Estado do Goiás - GO
 Gabinete - Go
 Rua 229, nº 95 Setor Universitário Goiânia - GO
 CEP: 74605-090 e (62) 3946-8100/ 8118 / 8199
 www.ibama.gov.br

Leis Castano

OF 02010.001015/2016-77 GABIN/GO/IBAMA

Goiânia, 30 de maio de 2016.

À Senhora
 Márcia Cristina Cury
 Professora da Universidade Federal de Uberlândia
 Av. Pará 1720 - BLOCO 4C, Laboratório Parasitologia ICBIM
 UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
 CEP.: 38400632

Assunto: **Aprovação de projeto de pesquisa**

Senhora Professora,

Em resposta ao ofício encaminhado por V. S.^a e, conforme Art5º da IN 23/2014 IBAMA, informo que a pesquisa intitulada "Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos em mamíferos de ambientes cativos" da aluna de mestrado Talita Silva Alves, está autorizada para execução no Centro de Triagem de Animais Silvestres -CETAS/GO, com as seguintes condicionantes:

- 1- Apresentar nas datas de coleta, autorização do SISBIO conforme IN 03/2014 - ICMBio;
- 2- Comunicar ao CETAS/GO, imediatamente após conhecimento da informação, casos de detecção de parasitas ou patógenos de importante interesse epidemiológico e que possam influenciar a decisão de destinação dos animais;

Recebemos
 Em 30/05/16



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
Superintendência do Ibama no Estado do Goiás - GO
Gabinete - Go
Rua 229, nº 95 Setor Universitário Goiânia - GO
CEP: 74605-090 e (62) 3946-8100/ 8118 / 8199
www.ibama.gov.br

3- Encaminhar cópia da dissertação, digital e impressa, ao final do projeto.

Atenciosamente,

EDILSON CARVALHO SIQUEIRA
Superintendente do IBAMA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais
Silvestres



AUTORIZAÇÃO

Uberlândia, 18 de novembro de 2015.

Autorizo as pesquisadoras Márcia Cristina Cury e Talita Silva Alves utilizar os mamíferos do acervo do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres para realização da pesquisa "Ocorrência e caracterização molecular de hemoparasitos em mamíferos de ambientes cativos do estado de Minas Gerais".

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'André Quagliatto Santos', written over the printed name.

Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Coordenador técnico do Laboratório de
Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres

**ANEXO B: Base farmacológica e respectivas dosagens de anestésicos inoculados nos mamíferos silvestres do estudo.
Cálculo efetuado segundo Carpenter et al (2010) e Viana et al (2003)**

ESPÉCIE	NOME POPULAR	BASE FARMACOLÓGICA	DOSE
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	Cetamina + Xilazina	15mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Sphiggurus spinosus</i>	Ouriço-cacheiro-peludo	Cetamina + Xilazina	20 mg/kg + 3,0 mg/kg
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço-cacheiro	Tiletamina + Zolazepam	5-10 mg/kg
<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelha-branca	Isoflurano ou Cetamina + Xilazina	3%, 200 ml/kg/min de O ² ou 20 mg/kg + 2,0 mg/kg
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 2,0 mg/kg
<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 2,0 mg/kg
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 2,0 mg/kg
<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Leopardus pardalis</i>	Leopardus pardalis	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Nasua nasua</i>	Quati	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão-pelada	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Eira barbara</i>	Irara	Tiletamina + Zolazepam	3,3 mg/kg
<i>Tapirus terrestris</i>	Tapirus terrestris	Isoflurano e Tiletamina + Zolazepam	5%, 200 ml/kg/min de O ² e 6 mg/kg
<i>Pecari tacaju</i>	Pecari tacaju	Tiletamina + Zolazepam	4 mg/kg
<i>Mazama gouazoubira</i>	Mazama gouazoubira	Cetamina + Xilazina	8 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Ozotoceros bezoarticus	Cetamina + Xilazina	8 mg/kg + 1,0 mg/kg
<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufo-preto	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 0,5 mg/ kg
<i>Allouata caraya</i>	Bugio	Cetamina + Xilazina	10 mg/kg + 0,5 mg/ kg
<i>Dasypus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	Tiletamina + Zolazepam	3 mg/kg
<i>Cabassous tatouay</i>	Tatu-do-rabo-mole	Tiletamina + Zolazepam	3 mg/kg