

NATASHA LAGOS MAIA

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

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

NATASHA LAGOS MAIA

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

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2012.

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Coorientador)

Márcio Antônio Moreira Galvão

Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, que sempre me apoiaram e aconselharam em todos os momentos do meu caminho.

Aos meus pais que sempre trabalharam com muita dedicação para me criarem, e pela família tão amorosa e companheira que formamos.

Ao prof. Tarcízio por ter me dado a grande oportunidade de ser sua orientada e de me aconselhar nos momentos difíceis. Pelo carinho e paciência, e também por ser tão apaixonado pelos animais.

Ao prof. Maфра pela orientação e paciência, e por ensinar os passos desse longo caminho. A todos os amigos e estagiários que me ensinaram muito com a convivência no CETAS-UFV e tiveram muita paciência em meus momentos menos equilibrados.

Aos animais por serem o combustível que alimenta essa minha vontade de seguir adiante para poder ajudá-los cada vez mais.

À todos os amigos e estagiários do LAPEM-UFV, pelas risadas e discussões construtivas sobre nossas linhas de pesquisa.

Agradeço aos amigos Moacir, Mariana e Graziella por cada momento de desabafo, longas conversas e pelos conselhos que sempre me deram.

Agradeço aos amigos Higo e Rafael por terem me apresentado o mundo da Biologia Molecular, pela paciência com as frequentes dúvidas.

Agradeço à Viviane, estagiária tão dedicada que ajudou e participou ativamente deste projeto.

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária que sempre me trataram com muito carinho.

À Rosi e Bete pelo carinho de todo dia e ajuda nos momentos de resolver prazos de entrega de documentos, matrícula, dentre outros.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de aprendizagem e ensino em uma instituição que preza pela qualidade.

À Deus por olhar sempre por cada um de nós, nos envolvendo com amor e esperança. Aos meus pais, que desde o meu nascimento dão a vida por mim e me envolvem com muito amor, amor este que me dá força para estar onde estou e para continuar a longa caminhada da vida.

Aos amigos, por compartilharem a vida comigo e me fortalecerem nos mais diversos momentos.

Ao meu orientador e co-orientador pela oportunidade e confiança que depositaram em mim.

DEDICO

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. DEGRADAÇÃO AMBIENTAL NO BRASIL: EMERGÊNCIA E RE-EMERGÊNCIA DE DOENÇAS.....	2
2.1.1. MEDICINA DA CONSERVAÇÃO	5
2.2. CENTROS DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES (CETAS): CARACTERIZAÇÃO DO CETAS/UFV.....	5
2.3. ANIMAIS SILVESTRES EM CATIVEIRO COMO RESERVATÓRIOS DE PATÓGENOS	8
2.4. DOENÇAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉDICO-VETERINÁRIA TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E PULGAS NO BRASIL	10
2.5. BIOAGENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉDICO-VETERINÁRIA	19
2.5.1. O GÊNERO <i>RICKETTSIA</i>	19
2.5.2. O GÊNERO <i>EHRlichia</i>	21
2.6. MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE BIOAGENTES HEMOPARASITOS E RIQUETSIAIS	22
2.6.1. COLETA E MANUSEIO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	22
3. HIPÓTESE.....	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GERAL	26
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26

5. MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1. COLETA DE MATERIAIS	27
5.1.1. ORIGEM DOS ANIMAIS SILVESTRES ESTUDADOS	27
5.1.2. COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	28
5.1.3. COLETA DE CARRAPATOS E PULGAS.....	28
5.2. EXTRAÇÃO DE DNA	29
5.2.1. AMOSTRAS DE SANGUE DOS ANIMAIS.....	29
5.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	30
5.3.1. O GÊNERO <i>RICKETTSIA</i>.....	30
5.3.2. O GÊNERO <i>EHRlichia</i>.....	31
6. RESULTADOS.....	33
6.1. ECTOPARASITAS.....	35
6.2. COLETA DE MATERIAL	35
6.3. EXTRAÇÃO DE DNA	38
6.4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	39
7. DISCUSSÃO	41
7.1. OCORRÊNCIA DE ECTOPARASITAS EM ANIMAIS SILVESTRES	41
7.2. DETECÇÃO DE BIOAGENTES EM AMOSTRAS DE SANGUE	45
7.3. DETECÇÃO DE BIOAGENTES EM AMOSTRAS DE ECTOPARASITAS.....	49
8. CONCLUSÃO.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de identificação dos animais no projeto de pesquisa.	33
Tabela 2: Lista de Identificação das amostras de carrapatos coletadas (<i>pools</i>).	34
Tabela 3: Lista de identificação das pulgas coletadas.	35
Tabela 4: Lista dos animais silvestres que tiveram amostras coletadas, no CETAS-UFV.	36
Tabela 5: Origem e classificação taxonômica dos carrapatos coletados no CETAS-UFV.	37
Tabela 6: Origem e classificação taxonômica das pulgas coletadas no CETAS-UFV.	38
Tabela 7: Resultados positivos para amostras de sangue testadas para os <i>primers</i> CS-5 e CS-6 (gênero <i>Rickettsia</i>).	39
Tabela 8: Resultados positivos para amostras de ectoparasitas testadas para os <i>primers</i> CS-5 e CS-6 (gênero <i>Rickettsia</i>).	39
Tabela 9: Resultados positivos para amostras de sangue testadas para os <i>primers</i> (ECC e ECB) (gênero <i>Ehrlichia</i>).	40

RESUMO

MAIA, Natasha Lagos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **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.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Coorientador: Cláudio Lígia Mafra de Siqueira.

Foram coletadas amostras de sangue e ectoparasitas (carrapatos e pulgas) de animais silvestres pertencentes à classe de mamíferos e aves, recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa, no Estado de Minas Gerais. A coleta da amostra de sangue e ectoparasitas era destinada para pesquisa de bioagentes através de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Todas as amostras foram testadas quanto à presença de agentes do gênero *Rickettsia* e *Ehrlichia*. Foram coletadas um total de 100 amostras de sangue, sendo 73 de animais da classe de aves e 27 da classe de mamíferos. As amostras de ectoparasitas totalizaram 63 carrapatos provenientes de treze animais e 47 pulgas, provenientes de cinco animais. As espécies de carrapato encontradas em mamíferos silvestres foram *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e a espécie de pulga encontrada foi *Ctenocephalides canis*. Na pesquisa de microorganismos pela PCR, foram positivas para a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia*, três amostras de aves e cinco amostras de mamíferos, além de quatro amostras de carrapatos do gênero *Amblyomma* e duas amostras de pulgas. Na pesquisa de bactérias do gênero *Ehrlichia*, foram positivas uma amostra de ave e três amostras de mamíferos, não tendo sido obtidas amostras positivas de ectoparasitas para este gênero.

ABSTRACT

MAIA, Natasha Lagos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Identification and characterization of bioagents in the order *Rickettsiales* transmitted by ticks and fleas on wild animals received by the Screening Center of Wild Animals (CETAS) Federal University of Viçosa, Minas Gerais.** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

We collected blood samples and ectoparasites samples (ticks and fleas) of wild animals belonging to the class of mammals and birds, received by the Screening Center of Wildlife, Federal University of Vicosa, in Minas Gerais. The collection of blood samples and ectoparasites was intended to search for bioagents using molecular techniques, the Polymerase Chain Reaction (PCR). All samples were testes for the presence of microorganisms of the genus *Rickettsia* (CS-5 and CS-6) and *Ehrlichia* (ECC and ECB). Were collected from a total of 100 samples of blood, 73 of the class of birds and 27 of the class of mammals. The samples totaled 63 ticks from 13 animals and 47 fleas from five animals. The tick species were found in wild mammals *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The species of flea *Ctenocephalides canis* was found. In search of bioagents by PCR three samples of birds and five samples of mammals were positive for the detection of bacteria of the genus *Rickettsia*, plus four samples of ectoparasites (ticks and fleas). In the study of bacteria of the genus *Ehrlichia*, one sample of bird was positive and three samples of mammals, no positive samples to that detection have been obtained of ectoparasites.

1. INTRODUÇÃO

Reconhecidamente, o desmatamento de grandes áreas de massas florestais para o crescimento urbano e da agroindústria, é um dos principais fatores responsáveis por desequilíbrios no meio ambiente em todo o mundo, resultando na fragmentação dos habitats, o que leva ao estreitamento do contato entre populações de animais silvestres, animais domésticos e seres humanos.

Presenciamos assim, a interferência direta no equilíbrio da relação entre hospedeiros vertebrados silvestres e micro-organismos mantidos por estes na natureza, sendo esta condição uma problemática para a sanidade deste grupo de animais e de todos os outros que mantem interação com os mesmos, destacando-se a emergência e re-emergência de doenças de grande importância na saúde pública.

Neste contexto, têm-se os estudos na área da medicina da conservação como imprescindíveis para o entendimento do ciclo natural das doenças, tendo como fator primordial de sua importância a necessidade de conhecimentos quanto a história natural de bioagentes com potencial zoonótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DEGRADAÇÃO AMBIENTAL NO BRASIL: EMERGÊNCIA E RE-EMERGÊNCIA DE DOENÇAS

O território brasileiro, dado à sua extensão, clima e localização geográfica, detém grande riqueza de biodiversidade, tanto de fauna como de flora. Grande parte desta diversidade encontra-se na Mata Atlântica, a qual pode ser vista como um mosaico diversificado de ecossistemas, apresentando estruturas e composições diferenciadas em função de diferenças de solo, relevo, ecologia e características climáticas existentes na ampla área de ocorrência desse bioma no Brasil (IBAMA, 2005).

Bastante afetadas pelos efeitos de fragmentação e isolamento florestal em todo o mundo estão as florestas tropicais (LAURENCE & BIERREGAARD, 1997; MYERS et al., 2000). Extensivas áreas destas florestas tem sido destruídas de forma rápida, deixando remanescentes florestais isolados em uma matriz de paisagens diversas (FONSECA, 1985; CHIARELLO, 1999).

No Brasil, nas últimas décadas, vem se observando a intensificação da destruição de diversos ecossistemas componentes da Mata Atlântica, tendo como causa disto a crescente ação antrópica, principalmente devido aos processos intensos de urbanização ocorridos nas últimas décadas e expansão agroindustrial, sendo os resultados desses impactos desastrosos para a manutenção de espécies silvestres únicas no planeta (CORRÊA & PASSOS, 2001).

Embora apresente altos índices de biodiversidade e endemismo, a Mata

Atlântica é o segundo ecossistema mais ameaçado do mundo (MITTERMEIER et al., 1998; MYERS et al., 2000). Devido à sua localização predominantemente litorânea, é alvo de forte pressão antrópica desde o descobrimento do Brasil pelos europeus (MENDES, 2004), tendo sido isto decisivo para gerar o padrão de distribuição de pequenos fragmentos secundários de Mata Atlântica, como os que são atualmente verificados na Zona da Mata de Minas Gerais (LOPES et al., 2002).

A maior parte das espécies silvestres ameaçadas de extinção no Brasil se encontra no bioma Mata Atlântica (ADANIA, 1998; SWANSON, 1998), sendo a fragmentação dos habitats o fator antropogênico mais importante associado com surtos de patógenos da vida selvagem, visto aumentar o contato entre animais que vivem em habitats não perturbados e outras espécies hospedeiras que habitam regiões antropizadas adjacentes (DOBSON & FOUFOPOULOS, 2001). Devido a este maior contato, verifica-se uma maior facilidade de disseminação de agentes infecciosos e parasitários, antes em equilíbrio com seus reservatórios silvestres, para populações de outras espécies de animais silvestres, animais domésticos e para a população humana (CORRÊA & PASSOS, 2001).

Conseqüentemente, como resultado dessas interações negativas, podem ocorrer a emergência e re-emergência de zoonoses com expansão epidêmica de agentes patogênicos à animais suscetíveis, associado ao aumento da sua disseminação geográfica (BARLLETT & JUDGE, 1997).

Dentre estas zoonoses, temos as doenças infecciosas emergentes, as

quais podem ser compreendidas como sendo “infecções originadas recentemente numa população, ou que, tendo existido previamente, se encontram em rápida ascensão quanto à incidência e ao alcance geográfico” (MORENS et al., 2004).

Entre os vários fatores para o aparecimento de doenças emergentes, encontram-se os demográficos (MORENS et al., 2004). Adensamentos populacionais resultantes da fragmentação de habitats, favorecem a transmissão direta de doenças devido ao aumento da competição, estresse e, ou, redução de alimento, tornando-os mais suscetíveis. Um outro fator refere-se à introdução de espécies novas em vida livre ou ao convívio em cativeiro, onde indivíduos de espécies que nunca teriam contato em condições naturais estabelecem contato diário (CUBAS et al., 2007).

De modo geral, o monitoramento da presença de patógenos em animais silvestres é fundamental para o controle de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes, na medida em que estas constituem um grande problema à saúde pública em todas as suas vertentes. Esta vigilância pode ser feita mediante várias abordagens, dentre as quais destacam-se: (1) a reunião do máximo de informação e a coleta de amostras dos animais recebidos por centros de animais silvestres; (2) a coleta de amostras em campo; (3) a execução de estudos científicos em que seja essencial a captura dos animais, para que seja possível a obtenção de dados sobre possíveis reservatórios e vetores de agentes patogênicos tanto ao homem e animais domésticos quanto à fauna silvestres (WEINHOLD, 2003).

2.1.1. Medicina da conservação

Considerada uma ciência essencialmente transdisciplinar, a Medicina da Conservação engloba o estudo dos contextos ecológicos inter-relacionados à saúde. Assim, como definição temos que a *“Medicina da conservação é a ciência para crise da saúde ambiental e a conseqüente perda da biodiversidade biológica, desenvolvida por meio da transdisciplinaridade na execução de pesquisas, ações de manejo e políticas públicas ambientais voltadas à manutenção da saúde de todas as comunidades biológicas e seus ecossistema”* (MANGINI & SILVA, 2007).

Neste contexto, esta ciência tem por objetivo maior o fornecimento de novas habilidades, ferramentas e visão para o campo da biologia da conservação e medicina, a fim de examinar de uma forma transdisciplinar a saúde dos indivíduos, dos grupos de indivíduos, das populações, comunidades e ecossistemas (POKRAS, 1995; AGUIRRE, 2002). Além disso, a Medicina da Conservação, visa manter a diversidade biológica, e como consequência, melhorar a qualidade de vida das pessoas, espécies domésticas e selvagens, sobretudo com a intenção de manter um ambiente saudável a plena saúde ecológica (MANGINI e SILVA, 2007).

2.2. CENTROS DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES (CETAS): CARACTERIZAÇÃO DO CETAS/UFV

Criado no ano de 1999, o Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) localiza-se no Campus da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, na região da Zona da Mata

Mineira, estado de Minas Gerais.

Como no restante da macrorregião de Viçosa e de outros municípios da área de influência do CETAS/UFV (Viçosa, Juiz de Fora, Cataguases, Muriaé, Ponte Nova e Manhuaçu), a região caracteriza-se por matas fragmentadas e próximas às áreas urbanizadas, sob forte ação antrópica (MANHÃES & LOURES-RIBEIRO, 2011) (Figura 1 e 2).



Figura 1: Imagem ilustrativa do município de Viçosa e dos outros municípios da área de influência do CETAS-UFV. Fonte: SOS rios do Brasil.



Figura 2: Foto de Satélite mostrando a região da Zona da Mata Mineira.

Fonte: Somar Meteorologia.

Em relação à estruturação deste centro, a mesma segue o padrão que é exigido para os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), conforme estabelecido pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis), na resolução Conama, número 237, de 19 de dezembro de 1997. A estrutura do CETAS-UFV inclui: sala de administração, sala de palestras, museu de anatomia comparada, banheiro, cozinha, área de serviço, almoxarifado, quarentena de aves, quarentena de mamíferos, ambulatório, sala de internação, sala do laboratório clínico, sala de necropsia, sala de cirurgia, sala de esterilização e recintos.

Programas de estágio, iniciação científica e pós-graduação são desenvolvidos neste centro de triagem, proporcionando assim o desenvolvimento de trabalhos e teses, informações muito relevantes sobre as diversas espécies de

animais encontradas neste local. Vale ressaltar, que trabalhos com animais de vida livre, encontrados nas matas que circundam a cidade de Viçosa, também são realizados, possibilitando, dessa forma, traçar paralelos entre espécies em cativeiro e de vida livre.

As espécies de animais que compõem a maioria das recepções no CETAS-UFV pertencem à classe de aves, sendo os indivíduos da classe de mamíferos recebidos em menor número.

2.3. ANIMAIS SILVESTRES EM CATIVEIRO COMO RESERVATÓRIOS DE PATÓGENOS

Estima-se que a fauna silvestre constitui um grande reservatório ainda desconhecido de bioagentes com potencial zoonótico. Embora a descoberta destes bioagentes esteja diretamente relacionada com o desenvolvimento de melhores ferramentas diagnósticas ao longo do tempo, o que possibilitou uma maior detecção dos mesmos, as principais causas de emergência ou re-emergência de doenças se deve principalmente às modificações dos habitats naturais e não somente à maior detecção diagnóstica. Outros fatores que também contribuem diretamente para o surgimento dessas doenças são, o comércio e translocação de animais vivos, o consumo de comidas exóticas, o desenvolvimento do ecoturismo, a posse de animais exóticos e o acesso à jardins zoológicos. Desta maneira, para redução do risco de zoonoses emergentes faz-se necessária a educação da população para os riscos existentes relacionados à essas práticas (CHOMEL et al., 2007), visto que tanto sendo provenientes de vida livre, como dos mantidos em cativeiro, os animais silvestres podem atuar como

reservatórios de agentes causadores de enfermidades de importância médica e médico-veterinária.

Em 1986, Acha & Szyfres descreveram como principais fatores de risco para a difusão de agentes infecciosos de origem silvestre, e importância no estabelecimento de processos zoonóticos, as seguintes questões: (1) a introdução de animais domésticos e, ou, do homem em um foco natural da doença; (2) a translocação de um hospedeiro infectado para regiões onde existam hospedeiros suscetíveis; (3) a ocorrência de ações que ocasionem modificações da dinâmica dos hospedeiros ou alterem o equilíbrio ecológico; (4) a translocação natural de animais reservatórios, devido, por exemplo, à escassez de alimento; (5) a intervenção do homem na modificação dos ecossistemas; (6) a interocorrência de aves migratórias e ectoparasitas vetores; e (7) as mutações positivas no processo epidêmico de um agente etiológico, facilitando sua disseminação e manutenção.

Atualmente, a realidade nos mostra que a crescente manutenção de animais silvestres em cativeiro, devido à falta de habitat para a realocação destes quando retirados do seu local de origem, tem ocasionado na ocorrência e no estudo de diversos agravos de saúde.

No entanto, este aumento no número de animais silvestres em cativeiro, tem exigido grandes esforços para a manutenção de um rigoroso manejo sanitário, buscando reduzir os efeitos dos contatos inter e intraespecífico. Apesar destes esforços, os ambientes de zoológico, criadouros e outros centros que abrigam animais silvestres continuam sendo bastante propícios à disseminação de

doenças, sendo muitas delas de caráter zoonótico (SEDGWICK et al., 1975; MONTALI & MIGAKI, 1980; SIEMERING, 1986; FOWLER, 1993; SILVA et al., 2001). Vale a pena ressaltar que a maioria destes animais mascara os sinais clínicos quando doentes ou não desenvolve a doença mesmo estando infectada pelo agente etiológico, constituindo-se desta maneira em fonte de infecção para animais domésticos e o homem ou mesmo para outros animais silvestres (ACHA & SZYFRES, 1986; FOWLER, 1986; CUBAS, 1996).

2.4. DOENÇAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉDICO-VETERINÁRIA TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E PULGAS NO BRASIL

No Brasil, o processo de urbanização acelerado à custa do desmatamento da Mata Atlântica proporcionou um maior contato entre as populações humanas (e de seus animais domésticos) com as populações de animais silvestres nos seus habitats originais. Esta interface entre habitat silvestre e áreas antropizadas quase sempre é intermediada pela ação de artrópodes hematófagos, os quais podem atuar como vetores de agentes patogênicos para o homem, bem como para animais domésticos e silvestres.

A intensificação desta relação reservatório vertebrado silvestre-vetor-hospedeiro vertebrado (seja o homem ou animais silvestres ou domésticos), facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, resultando na emergência e re-emergência de zoonoses, bem como de doenças infecciosas nos animais silvestres, outrora ainda não relatadas (CORRÊA & PASSOS, 2001).

Devido à ação espoliativa sobre os mais diversos tipos de hospedeiros vertebrados (inclusive o homem), os artrópodes hematófagos são responsáveis pela transmissão de diversos tipos de zoonoses. De acordo com a definição de GALVÃO & SILVA (2004), as zoonoses são "*doenças ou infecções que são transmitidas naturalmente entre os animais vertebrados (domésticos ou silvestres) e o homem, ou vice-versa*".

Dentre os principais artrópodes hematófagos vetores de doenças, destacam-se os carrapatos e as pulgas.

2.4.1. Dos carrapatos

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à ordem Acari, classe Arachnida, com aproximadamente 885 espécies de carrapatos conhecidas (HORAK et al., 2002; PRAKASAN & RAMANI, 2007; APANASKEVICH & HORAK, 2008; LABRUNA et al., 2008; VENZAL et al., 2008; NAVA et al., 2009), constituindo um grupo de grande importância médica e médico-veterinária. De ampla distribuição, parasitam uma grande variedade de hospedeiros, encontrando-se e entre os mais importantes vetores de agentes patogênicos para os animais domésticos e para o homem (DANTAS-TORRES & FIGUEIREDO, 2006, 2007; DANTAS-TORRES, 2008a,b)

Frequentes relatos sobre a ocorrência de carrapatos neotropicais de animais silvestres em cães domésticos tem sido realizados (SZABÓ et al., 2001; LABRUNA et al., 2005; ABEL et al., 2006; SZABÓ et al. 2007), demonstrando o acesso dos animais domésticos às áreas naturais, onde são mantidas populações

de ectoparasitas (SZABÓ et al., 2009).

Atualmente, conhece-se uma ampla gama de doenças infecciosas transmitidas por carrapatos à vertebrados silvestres, domésticos e ao homem, das quais apresentaremos duas de considerável potencial zoonótico.

2.4.1.1. A Febre Maculosa

Muitas doenças infecciosas e parasitárias afligem o homem. Dentre estas, as doenças causadas por espécies de bactérias do gênero *Rickettsia* colocam-se entre aquelas que mais promovem sofrimento e morte, inclusive para vários pesquisadores pioneiros no diagnóstico e na pesquisa sobre as mesmas (GALVÃO, 1996).

Causada por bactérias gram-negativas, de caráter intracelular obrigatório, pertencentes ao gênero *Rickettsia*, a Febre Maculosa decorre da infecção preferencial das células endoteliais, sendo clinicamente caracterizada pelo surgimento de exantemas (manchas vermelhas) por todo corpo do paciente (GALVÃO, 1996).

Denominada no Brasil como Febre Maculosa Brasileira (FMB), é conhecida nos Estados Unidos da América como “*Rocky Mountain Spotted Fever*” (RMSF), apresentando em ambos os casos a bactéria *Rickettsia rickettsii* como agente etiológico (SAHNI & RYDKINA, 2009). De caráter zoonótico, a FMB atualmente é considerada a riquetsiose de maior importância médica no Brasil, sendo disseminada principalmente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (SOUZA et al.,

2004; BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; LABRUNA, 2009), em especial o *Amblyomma cajennense* (PINTER & LABRUNA, 2006), embora o *Amblyomma aureolatum* e o *Amblyomma dubitatum* também estejam associados à transmissão em algumas situações epidemiológicas (LEMOS, 2002).

A infecção por *R. rickettsii*, a principal e mais patogênica espécie relacionada com os casos clínicos relatados, inicialmente ocasiona sinais clínicos inespecíficos como febre alta, cefaléia, mal-estar generalizado, hiperemia de conjuntivas, diarreia, vômito, dor abdominal, anorexia, presença de exantemas e sensibilidade em articulações e músculos (MANDELL et al., 1995; ABRAMSON & GIVNER, 1999). A evolução da doença pode levar a quadros de vasculite, culminando em necrose vascular e quadros de hemorragia, posteriormente resultando em coagulação intravascular disseminada (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

No Brasil, esta doença foi notificada pela primeira vez na década de 20 no estado de São Paulo (MONTEIRO & FONSECA, 1932; PIZA, 1932). No estado de Minas Gerais, casos e surtos foram inicialmente descritos em 1929, passando por um longo período sem relatos até a década de 80 (GALVÃO, 1996), quando se iniciou o relato de inúmeras epidemias em áreas rurais e peri-urbanas, com os registros ocorrendo em quase todas as áreas do estado, principalmente na região dos Vales do Mucuri, Jequitinhonha e Rio Doce (GALVÃO et al., 2003; OLIVEIRA, 2004). Recentemente, foram relatados casos da Febre Maculosa Brasileira na Zona da Mata Mineira, mais especificamente nos municípios de Coronel Pacheco (GUEDES et al., 2005) e Viçosa (MAFRA et al., 2004).

No Brasil, dentre as espécies silvestres consideradas, até o momento, hospedeiros e amplificadores eficientes destas bactérias na natureza, estão as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) (LABRUNA et al., 2009). Além desses animais, também já foram indicados o cão doméstico (*Canis familiaris*); o cachorro do mato (*Dusicyon* sp.); o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*); o preá (*Cavia aperea*); e a cutia (*Dasyprocta azarae*) (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935), sem a comprovação definitiva quanto a participação dos mesmos.

Recentemente, algumas espécies de pássaros como *Turdus rufiventris*, *Conopophaga lineata*, *Cranioleuca obsoleta*, *Furnarius rufus*, *Saltator similis* e *Zonotrichia capensis* também têm sido incriminadas como reservatórios de carrapatos da espécie *A. aureolatum* (na fase larval), os quais são potenciais vetores de *R. rickettsii* no Brasil (LEMOS, 2002; ARZUA et al., 2003).

2.4.1.2. As Erliquioses

As erliquioses são doenças causadas por riquetsias pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, família *Anaplasmataceae*, ordem *Rickettsiales* (VIEIRA et al., 2011), constituindo um grupo de enfermidades emergentes de importância médica e médico-veterinária causadas por bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que infectam uma ampla gama de mamíferos. Inicialmente, este gênero incluía dez espécies, as quais eram classificadas de acordo com a célula infectada: monócitos (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*),

granulócitos (*Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*) e trombócitos (*Ehrlichia platys*). Após o surgimento de novas ferramentas foram realizadas análises das sequências gênicas destas espécies, o que levou a uma reorganização do gênero. Este passou a ser composto por apenas cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001; VIEIRA et al., 2011), sendo as demais reclassificadas nos gêneros *Anaplasma* e *Neorickettsia* (VIEIRA et al., 2011).

As bactérias do gênero *Ehrlichia* apresentam tropismo pelo tecido hematopoiético, sendo a maioria parasita de leucócitos e plaquetas (SKOTARCZAK, 2003). Estes organismos causam duas doenças distintas, a Erliquiose Monocítica (EM) e a Erliquiose Granulocítica (EG) (WALKER e DUMLER, 1997), as quais podem acometer mamíferos domésticos e selvagens, além do homem. A EM é causada por *E. canis*, que acomete cães, e pela *E. chaffeensis*, que acomete seres humanos. A espécie *E. ewingii* está relacionada com casos de EG em cães e seres humanos (SKOTARCZAK, 2003).

Os organismos do gênero *Ehrlichia* são transmitidos principalmente através da picada de carrapatos infectados, sendo a elevada prevalência das erliquioses em regiões tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica de seus vetores (ANDEREG & PASSOS, 1999). A transmissão da *E. canis* infectando cães ocorre principalmente pela picada de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* infectados (DANTAS-TORRES, 2008). Há suspeito envolvimento da espécie *A. cajennense* atuando como vetor de *E. canis* em zonas rurais do Brasil (COSTA JR et al., 2007).

Os sinais clínicos da erliquiose variam de acordo com a severidade da infecção, a resposta imunológica do hospedeiro, os órgãos atingidos, a espécie de erliquia envolvida e a presença de co-infecção com outras erliquias ou outros patógenos transmitidos pelo mesmo vetor (BREITSCHWERDT et al., 1998). Do ponto de vista clínico, o diagnóstico etiológico é importante para o monitoramento epidemiológico. No entanto, a maioria dos dados clínicos rotineiramente usados apresentam limitações, uma vez que os sintomas das erliquioses, especialmente em humanos, são gerais e pouco específicos, podendo levar ao óbito (OLANO et al., 2003; WALKER et al., 2004). Em geral, os principais sintomas são febre, dores de cabeça, mialgias e arrepios. Leucopenia, trombocitopenia, anemia e elevação dos níveis séricos das aminotransferases hepáticas são achados característicos nos exames laboratoriais (ANDERSON et al., 1992; BELONGIA et al., 1999). Os sinais clínicos e sintomas das erliquioses são muito similares aos de outras enfermidades veiculadas por carrapatos, como a Febre Maculosa Brasileira (FMB), o que dificulta o seu diagnóstico diferencial quando baseado apenas pelos achados clínicos (DAGNONE et al., 2001; LABRUNA et al., 2007).

No Brasil, a erliquiose é considerada de grande distribuição na espécie canina (DANTAS-TORRES, 2008a). As espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* são relatadas como as de maior ocorrência (ALMOSNY, 1998; MACHADO et al., 2006; LABRUNA et al. 2007), sendo a *E. canis* a de maior prevalência em cães (TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007). Apesar de existirem poucos relatos em nosso território sobre a presença da espécie *E. ewingii*, a mesma já foi relatada em

quadros clínicos envolvendo cães no estado de Minas Gerais, município de Viçosa (OLIVEIRA, 2008).

Estes organismos encontram-se mundialmente distribuídos, sendo que várias espécies de erliquia estão relacionadas à erliquiose em animais, tais como cães, equinos, ruminantes e felinos, e no homem (DAGNONE, 2001). Em animais silvestres, existem relatos de que espécies de cervídeos podem ser infectadas por organismos deste gênero (YABSLEY et al., 2002; MACHADO et al. 2006; KAWAHARA et al., 2009; LEE et al., 2009). Nos Estados Unidos, o cervo de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) é considerado o principal reservatório de *E. chaffeensis* e possivelmente de *E. ewingii* (YABSLEY et al., 2002; KAWAHARA et al., 2009). Na África e nas Ilhas do Caribe, existem relatos da infecção de ruminantes silvestres e domésticos por *E. ruminantium*, sendo considerado um agente zoonótico de grande importância (ALLSOP, 2010). No Brasil, em cervos-do-pantanal foram encontrados resultados positivos quando da investigação molecular de *E. chaffeensis* (MACHADO et al., 2006).

A incidência das erliquioses vem aumentando nos últimos anos em todo o mundo, inclusive com diversos relatos de casos fatais tanto em animais como no homem (OLANO et al., 2003). No entanto, tal aumento deve-se não somente pela emergência da enfermidade em si, mas também ao aumento da informação e capacitação nos sistemas de vigilância epidemiológica e da padronização e aplicação de técnicas mais sensíveis para o diagnóstico laboratorial (biologia molecular), tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais (WALKER et al., 2004).

A erliquiose humana também foi relatada na Venezuela, sendo identificadas por diagnóstico molecular as espécies *E.canis* e *E. chaffeensis* (PEREZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2008). Em território brasileiro, há confirmação sorológica de humanos infectados, no estado de Minas Gerais (CALIC et al., 2004).

2.4.2. Das pulgas

As pulgas pertencem ao Filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Siphonaptera, sendo as dos gêneros *Pulex* e *Ctenocephalides* as mais frequentemente reportadas na transmissão de organismos do gênero *Rickettsia*. Estes insetos não demonstram claramente as delimitações normais entre as partes do corpo (cabeça, tórax e abdômen) como a maioria dos insetos, sendo achatados lateralmente e não possuindo asas, com o terceiro par de pernas bem mais largo e robusto, o que permite uma grande capacidade de salto. Pulgas adultas são, normalmente, de coloração entre o marrom escuro e médio (FORTES, 2004).

Na medicina veterinária, as pulgas são comumente encontradas em cães e gatos. Entretanto, estes ectoparasitos também vivem em uma variedade de outros animais domésticos e pequenos selvagens. Em geral, as pulgas se mudam para uma espécie diferente de hospedeiro se o hospedeiro preferencial está inacessível, além de os deixarem após a obtenção do alimento (SLOSS et al., 1999).

Das duas mil espécies e sub-espécies de pulgas existentes no mundo, apenas algumas atuam como vetores de doenças humanas, tais como a peste

bubônica ou peste negra (*Yersinia pestis*), o tifo murino (*Rickettsia typhi*), riquetsiose felis (*Rickettsia felis*) e a doença da arranhadura do gato (*Bartonella henselae*). Vários dos agentes transmitidos pelas pulgas são mantidos em um ciclo zoonótico envolvendo mamíferos como hospedeiros naturais, tais como roedores, cães, gatos selvagens, guaxinins e esquilos, sendo os vetores trazidos para o contato com o homem via animais domésticos. Contudo, as doenças por estes transmitidas tornam-se epidêmicas nas populações humanas apenas quando há uma diminuição dos hospedeiros vertebrados naturais destes artrópodes, fazendo com que as mesmas passem a procurar outras fontes de alimento por meio da hematofagia, o que torna o homem um hospedeiro acidental (AZAD & BEARD, 1998).

No ano de 2000, OLIVEIRA e cols., em estudo de dois casos fatais de Febre Maculosa Brasileira (duas crianças de uma mesma família) no município de Coronel Fabriciano, Estado de Minas Gerais, detectaram, via técnicas de biologia molecular (*Nested-PCR*) a presença de *R. felis* em amostras de pulgas (*Ctenocephalides* spp.) coletadas de cães residentes na mesma residência que as duas vítimas. Essa foi a primeira vez que *R. felis* foi detectada em *Ctenocephalides* spp., sendo este ectoparasita incriminado, desde então, como potencial transmissor de *R. felis*.

2.5. BIOAGENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉDICO-VETERINÁRIA

2.5.1. O gênero *Rickettsia*

As riquetsias são parasitas intracelulares obrigatórios, requerendo células

endoteliais para se replicarem. São bactérias gram-negativas que se especializaram em nichos ecológicos muito restritos, com seu ciclo natural dependendo apenas de um hospedeiro para sua manutenção no meio, geralmente um artrópode (BACELLAR, 1996).

As bactérias do gênero *Rickettsia* são classificadas em quatro grupos baseados de acordo com suas características biológicas, genéticas e antigênicas (GILLESPIE et al., 2007): Grupo da Febre Maculosa (GFM), Grupo do Tifo, Grupo de Transição e Grupo Ancestral. O GFM, um dos focos deste projeto, inclui organismos com alta patogenicidade, como a espécie *R. rickettsii*, responsável pela Febre Maculosa das Regiões Montanhosas (RICKETTS, 1906; WALKER, 1989) e pela Febre Maculosa Brasileira (SAHNI; RYDKINA, 2009); a *R. conorii*, agente etiológico da Febre Butonosa do Mediterrâneo (WALKER, 2007); a *R. africae* que causa a Febre de Picada de Carrapato na África (RAOULT et al., 2001); e a *R. parkeri*, que provoca a Febre Maculosa Moderada, encontrada no norte e sul do continente americano (PARKER, 1940).

A patogenicidade de uma espécie de riquetsia pode estar ligada, dentre outros fatores, à habilidade do hospedeiro artrópode em picar o ser humano. Por exemplo, espécies de riquetsias identificadas em besouros não implicaram em doenças para humanos, visto este hospedeiro não picar o ser humano (CHEN et al., 1996). Entretanto, é possível que quando uma riquetsia é detectada em um hospedeiro artrópode capaz de picar o homem, esta possa ser considerada como um patógeno humano potencial.

O reservatório natural das riquetsias do grupo da Febre Maculosa incluem carrapatos ixodídeos de vários gêneros e espécies (AZAD et al., 1998), com a associação riquetsia-carrapatos representando a alta adaptabilidade entre as mesmas, decorrente de seu contato e adaptações durante o processo evolutivo. A íntima relação da bactéria com seus vetores hospedeiros é caracterizada por uma eficiente multiplicação, manutenção e transmissão transestadial e transovariana, além da extensa distribuição ecológica e geográfica (AZAD et al., 1998).

Riquetsias com relação próxima ou idêntica à *R. rickettsii* tem sido encontradas em *A. americanum*, *A. maculatum*, *Dermacentor occidentalis*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus* e *Ixodes cookei*. Estes carrapatos parasitam seres humanos e devem ser considerados potenciais vetores de *R. rickettsii* (GODDARD & NOUMENT, 1986).

O *A. cajennense* é o principal vetor de *R. rickettsii* na América Central e do Sul, possuindo uma grande afinidade em parasitar seres humanos, sendo encontrado principalmente no Panamá e no Brasil (RODANICHE, 1953; GUEDES et al., 2005). Outro carrapato implicado como vetor de *R. rickettsii* no Brasil é o *A. aureolatum*, também conhecido como carrapato amarelo do cão (PINTER & LABRUNA, 2006).

2.5.2. O gênero *Ehrlichia*

O Gênero *Ehrlichia* compreende bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias que infectam preferencialmente monócitos e granulócitos nos mais diversos mamíferos (DUMLER et al., 2001; WALKER et al., 2004). São bactérias

relativamente pequenas (0,22um de diâmetro) em formato de cocos, com seu crescimento ocorrendo dentro de vesículas (vacúolos) no citoplasma das células hospedeiras, onde se proliferam formando colônias denominadas de mórulas, as quais podem ser visualizadas por microscopia ótica, com as colorações de Giemsa e Romanovsky (THRALL et al., 2007).

A transmissão de bactérias do gênero *Ehrlichia* ocorre durante o repasto sanguíneo pela saliva de carrapatos infectados, podendo causar enfermidade em diversos vertebrados, como cães, eqüinos, ruminantes, felinos e homem, ocasionando manifestações clínicas diversas em hospedeiros vertebrados. Essas manifestações variam geograficamente conforme a espécie do gênero *Ehrlichia* envolvida na infecção (DUMLER et al., 2001).

No Brasil, os primeiros casos de Erliquiose Humana foram relatados em 2004, no Estado de Minas Gerais (CALIC et al., 2004). A primeira detecção molecular da espécie *E. ewingii*, um dos agentes da Erliquiose Granulocítica Humana, em cães do município de Viçosa, no mesmo Estado (OLIVEIRA, 2008). Ambos relatos ocorreram no Estado de Minas Gerais, que se caracteriza por apresentar regiões endêmicas para outras zoonoses transmitidas por carrapatos, de aspectos clínicos similares às erliquioses, como a Febre Maculosa Brasileira (GALVÃO, 1996).

2.6. MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE BIOAGENTES HEMOPARASITOS E RIQUETSIAIS

2.6.1. Coleta e manuseio de amostras sanguíneas

Em geral, o volume de sangue que pode ser coletado de forma segura do animal, em uma única coleta, corresponde a 1% do peso corporal do mesmo (THRALL et al., 2007). Na maioria dos mamíferos saudáveis, o volume de sangue retorna ao normal após 24 horas da coleta, podendo demorar cerca de duas semanas para que os constituintes do sangue retornem à normalidade. Em pequenos mamíferos caudados, por exemplo, camundongos e ratos, a veia da cauda é a de escolha para a obtenção de amostras de sangue. Em mamíferos, de forma geral, há a escolha e possibilidade de se fazer a venopunção através da veia safena lateral, veias auriculares, veia jugular, veia cefálica e veia cava cranial, sempre adequando ao tamanho e situação necessárias para se realizar a coleta em cada um desses pontos (THRALL et al., 2007).

Em aves, a quantidade a ser obtida, de forma segura, depende do seu tamanho e condição corporal. Geralmente, um volume que corresponde a 1% ou menos, do peso corporal, pode ser retirado de aves saudáveis, sem efeito prejudicial. Pode-se afirmar que para exames hematológicos de rotina, em aves, uma amostra de 0,2 mL é adequada (THRALL et al., 2007).

2.6.2. Técnicas moleculares para detecção de agentes patogênicos

O aprimoramento das técnicas baseadas em Biologia Molecular proporcionou o advento de métodos mais sensíveis, baseados na detecção de DNA de agentes patogênicos tanto em amostras ambientais (carrapatos) como em amostras de pacientes, através da amplificação do DNA do patógeno alvo. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se revelado uma técnica muito

promissora para este propósito, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, esta técnica apresenta certas vantagens sobre as técnicas imunológicas uma vez que permite a obtenção de seqüências de DNA do patógeno amplificadas, que após serem seqüenciadas podem ser utilizadas para análises *in silico* (MILLAR et al., 2003), o que permite a comparação entre as diferentes características das espécies causadoras de riquetsioses e hemoparasitoses, bem como, estabelecer relações filogenéticas dos organismos achados.

Diversos autores tem demonstrado que a PCR é uma técnica mais sensível do que o exame microscópio de esfregaços sanguíneos para a detecção de hemoparasitos, como, por ex., *Plasmodium* spp. e *Hepatozoon* spp. no sangue de mamíferos, répteis e aves (FELDMAN et al., 1995; PERKINS et al., 1998; RIBEIRO et al., 2005).

No entanto, a aplicação da PCR para fins de diagnóstico apresenta ainda algumas limitações. Mesmo com o fim da reação, após uma amplificação exponencial, a detecção de fragmentos de DNA amplificados muitas vezes não é possível, uma vez que os géis de agarose ou poliacrilamida ou até mesmo corantes convencionais, como o brometo de etídeo, não possuem resolução e sensibilidade suficientes para a detecção de bandas com pequenas quantidades de DNA amplificado. Isso aumenta o risco de falsos negativos, limitando o potencial de aplicação da PCR para fins de diagnóstico molecular (SMITH & OSBORN, 2009).

3. HIPÓTESE

A fauna silvestre recebida e mantida no CETAS/UFV, seus artrópodes parasitas e bioagentes da ordem *Rickettsiales* associados representam risco em potencial para a transmissão de doenças às espécies domésticas, para outras espécies silvestres suscetíveis e para o homem.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar, por meio de técnicas biomoleculares, bioagentes veiculados por carrapatos e pulgas parasitas dos animais silvestres recebidos pelo CETAS/UFV, caracterizando o perfil epidemiológico destes como suporte para adoção de medidas de manejo da fauna e profilaxia de doenças relacionadas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir com os conhecimentos sobre a fauna de animais silvestres, seus ectoparasitos e dos agentes patogênicos circulantes nos ecossistemas de distribuição destes;
- Testar *primers* e padronizar protocolos de detecção molecular (PCR) citados na literatura científica nacional e internacional para agentes riquetsiais do gênero *Rickettsia* e *Ehrlichia*, de origem regional presentes nas espécies endêmicas de animais silvestres;
- Investigar através de técnicas moleculares (PCR), a presença de patógenos dos gêneros *Rickettsia* e *Ehrlichia* em carrapatos e amostras de sangue coletados de animais recebidos no CETAS-UFV;
- Fazer inferência sobre a relação patógeno-vetor-hospedeiro silvestre, considerando as espécies de artrópodes ectoparasitos coletadas, bem como os possíveis bioagentes patogênicos encontrados nestes e no sangue do hospedeiro vertebrado de origem.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O referido projeto foi submetido para análise à Comissão de Ética e uso de Animais na Pesquisa, Ensino e Extensão na Universidade Federal de Viçosa, sendo o número de registro 106/12.

5.1. COLETA DE MATERIAIS

5.1.1. Origem dos animais silvestres estudados

As amostras de sangue e carrapatos foram obtidas de animais da fauna silvestre recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), no período de 2010 a 2011.



Figura 3 – CETAS-UFV, localizado no município de Viçosa – MG. Fonte: Foto de Satélite – Google Earth.

5.1.2. Coleta de amostras de sangue

A coleta de sangue foi realizada tanto nos animais silvestres recebidos, como nos animais que já estavam sendo mantidos no CETAS-UFV quando do início deste trabalho.

Em mamíferos, as coletas de sangue foram realizadas através da venopunção das veias cefálica ou safena. Sendo preconizada a obtenção de 0,5 a 1,0 mL de sangue destes animais, variando de acordo com o porte e peso do animal. Em aves, as coletas de sangue foram realizadas através da venopunção das veias jugular ou alar. Sendo preconizada a obtenção de 0,1 a 0,5 mL de sangue destes animais, variando de acordo com o porte e peso do animal.

As amostras obtidas foram acondicionadas em tubos de vidro com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético), sendo encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (DBB/UFV), onde foram mantidas em freezer -20°C para posterior verificação de hemoparasitas por técnicas de detecção molecular (PCR).

5.1.3. Coleta de carrapatos e pulgas

Realizou-se a vistoria manual com auxílio de pentes e escovas, de acordo com cada espécie animal, quanto à presença de carrapatos e pulgas. Estes foram coletados e acondicionados em frascos individuais (relativos a cada vertebrado

silvestre) e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM-DBB/UFV). Foi realizada a identificação taxonômica de acordo com a chave de identificação de ixodídeos descrita por Aragão e Fonseca (1961), e de pulgas de acordo com Linardi & Guimarães (2000).

Após a identificação taxonômica, os carrapatos e as pulgas foram separados em lotes (microtubos de 2 mL) de acordo com os seguintes parâmetros: gênero ou espécie, animal de origem e data de coleta. Os lotes assim formados foram catalogados e estocados em freezer -20°C para as etapas posteriores de extração de DNA e PCR para investigação molecular de agentes patogênicos.

5.2. EXTRAÇÃO DE DNA

5.2.1. Amostras de sangue dos animais

A extração de DNA das amostras de sangue de aves e mamíferos silvestres, previamente acondicionadas em freezer -20°C , foi realizada através do kit *Wizard[®] Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. O DNA obtido deste processo foi acondicionado em microtubos de 2 mL e mantido no freezer -20°C até o início da etapa posterior.

5.2.2. Amostras de carrapatos e pulgas

Inicialmente, os ectoparasitas foram separados de forma individualizada em microtubos de 2mL. Para extração de DNA de carrapatos e pulgas, foi utilizado primeiramente o método de fervura com hidróxido de amônio, de acordo com o

protocolo descrito por Cristova e cols. (2001). Após este método, utilizou-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a verificação da presença de microrganismos dos gêneros *Rickettsia* e *Ehrlichia* nas amostras de DNA de carrapatos e no sangue dos animais silvestres recebidos e, ou, mantidos no CETAS/UFV, foram utilizadas as técnicas de PCR com *primers* gênero-específicos. Cada amostra foi testada individualmente para a pesquisa destes bioagentes.

5.3.1. O gênero *Rickettsia*

A investigação molecular de bactérias do gênero *Rickettsia* nas amostras de carrapatos e de sangue dos animais silvestres foi realizada em cada amostra pela técnica de PCR, através da utilização de *primers* gênero-específicos. As amostras de DNA de *Rickettsia* e *Ehrlichia* utilizadas como controle positivo para as PCRs foram disponibilizadas pelo Dr. David H. Walker, Diretor do *Center for Biodefense and Emerging Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston* (EUA).

Foi realizada PCR simples com o par de *primers* CS-5 (5'-GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT-3) (*forward*) e CS-6 (AGGGTCTTCGTGCATTTCTT) (*reverse*) que amplificam um fragmento de 147 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*gltA*) presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004; HORTA et al., 2007). Cada reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25 μ L, sendo 2,5 μ L do DNA

extraído de cada amostra e 22,5uL do Mix (12,6ul de água de miliqui; 2,5uL de Buffer; 2,5uL de dNTP; 1,5uL de cada primer utilizado; 1,5uL de Cloreto de Magnésio ; e 0,4uL de Taq polimerase. Para o controle negativo foi utilizado 1,0uL de água ultra-pura. Para o controle positivo, foi utilizado 1,0uL de DNA de *R. rickettsii*. A reação de PCR foi realizada em um termociclador *Mini Cyclor™* (MJ Research, Inc., Canada). De acordo com Guedes e cols. (2005), as condições para a PCR dos *primers* CS-5 e CS-6 foram as seguintes: 1 ciclo à 95°C durante 2 minutos, seguidos por 50 ciclos de 15 segundos à 95°C, 30 segundos à 50°C e 30 segundos à 60°C.

Os produtos das reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% e posteriormente corados com brometo de etídeo 1ug/mL para visualização em transluminador sob luz violeta, com fins de identificação das bandas e fotodocumentação pelo *Eagle Eye™* II (Stratagene®).

5.3.2. O gênero *Ehrlichia*

As amostras de DNA foram testadas por PCR para a presença de bactérias do gênero *Ehrlichia*, sendo utilizados *primers* que amplificam uma região do gene 16S rRNA presente em todos os organismos deste gênero. Para a primeira reação foram utilizados os *primers* ECC (5'AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') (*foward*) e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') (*reverse*) que amplificam um fragmento de 478 pb de todas *Ehrlichia* sp. (DAWSON et al., 1994, 1996). Cada reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25uL, sendo 2,5uL do DNA extraído de cada amostra e 22,5uL do Mix (12,6ul de água de miliqui; 2,5uL de Buffer; 2,5uL de dNTP; 1,5uL de cada primer utilizado; 1,5uL de

Cloreto de Magnésio; e 0,4uL de Taq polimerase. Para o controle negativo foi utilizado 1,0uL de água ultra-pura. Para o controle positivo, foi utilizado 1,0uL de DNA de *E. canis*. As condições da PCR com os *primers* ECB e ECC foram realizadas de acordo Nakaghi e cols. (2010), com o seguinte programa: uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 40 a 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos por uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. As PCRs serão realizadas no termociclador *Mini Cycler*TM (MJ Research, Inc., Canada).

Os produtos das reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% e posteriormente corados com brometo de etídeo 1ug/mL para visualização em transluminador sob luz violeta, com fins de identificação das bandas e fotodocumentação pelo *Eagle Eye*TM II (Stratagene®).

6. RESULTADOS

As amostras de sangue coletadas receberam identificação de acordo com a classe animal a qual pertencem, de acordo com a Tabela 1. As amostras de ectoparasitas coletadas foram identificadas de acordo com o estágio e espécie aos quais pertencem, sendo organizadas em *pools* (Tabela 2 e 3).

Tabela 1 – Lista de identificação dos animais no projeto de pesquisa.

Nome Científico	Nome Vulgar	Identificação no Projeto
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	A1 a A3
<i>Pionus maximiliani</i>	Maritaca	A4 a A65
<i>Primolius maracana</i>	Maracanã	A66 a A69
<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	A70 e A71
<i>Pteroglossus castanotis</i>	Araçari-castanho	A72
<i>Penelope Obscura</i>	Jacuaçu	A73
<i>Mazama gouazubira</i>	Veado-catingueiro	M1
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	M2 a M4
<i>Cuniculus paca</i>	Paca	M5
<i>Nasua nasua</i>	Quati	M6 e M7
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	M8 a M15
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	M16 a M18
<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato mourisco	M19
<i>Didelphis aurita</i>	Gambá-de-orelhas-pretas	M20 a M22
<i>Callithrix penicillata</i>	Mico-estrela	M23
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	M24 e M25
<i>Bradypus tridactylus</i>	Bicho-preguiça	M26

<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	M27
------------------------	------------------	-----

* A= Ave ; M=Mamífero

Tabela 2 – Lista de Identificação das amostras de carrapatos coletadas (*pools*).

Origem da coleta (Animal e identificação)	Carrapatos (Classificação taxonômica e estádios)																				
	<i>Amblyomma cajennense</i>			<i>Amblyomma dubitatum</i>			<i>Amblyomma aureolatum</i>			<i>Amblyomma ovale</i>			<i>Amblyomma nodosum</i>			<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>		
	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M
Capivara (M2)		1e		1a 1b	1d	1c															
Tamanduá-mirim (M24)															2						
Quati (M6)												3									
Jaguatirica (M16)																				4	
Lobo-guará (M8)		5																			
Tamanduá-mirim (M25)	6a													6b	6c						
Sagui (M23)	7																				
Lobo-guará (M9)				8																	
Lobo-guará (M11)									9												
Capivara (M4)		10 a				10 b															
Capivara (M3)		11 a	11 b		11 c	11 d															
Cachorro-do-mato (M27)	12 a							12 b	12 c						12 d						
Gambá (M20)																	13				

*N=Ninfa ; F=Fêmea ; M=Macho

Tabela 3 – Lista de identificação das pulgas coletadas.

Espécie animal	Identificação no projeto	Identificação das amostras	Pulgas (Classificação taxonômica)
Gambá (M20)	M20	P1	<i>Ctenocephalides canis</i>
Gambá (M21)	M21	P2	<i>Ctenocephalides canis</i>
Cachorro-do-mato (M27)	M27	P3	<i>Ctenocephalides canis</i>
Lobo-guará (M14)	M14	P4	<i>Ctenocephalides canis</i>
Lobo-guará (M15)	M15	P5	<i>Ctenocephalides canis</i>

*P=Pulga

6.1. ECTOPARASITAS

Foi coletado um total de 63 carrapatos, originários de 13 animais, e 47 pulgas provenientes de cinco animais (dentre estes, três estão na lista de presença de carrapatos). Na classificação taxonômica dos carrapatos foram encontrados espécimes em todos os estádios e das seguintes espécies: *A. cajennense*, *A. dubitatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma nodosum*, *A. aureolatum*, *R. sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A identificação de pulgas demonstrou a presença de apenas uma espécie, *Ctenocephalides canis*.

6.2. COLETA DE MATERIAL

6.2.1. Coleta de Amostras de Sangue

A coleta de amostras de sangue foi realizada de um total de 100 animais, sendo 73 da classe de aves e 27 da classe de mamíferos. As espécies das quais

foram obtidas amostras de sangue estão demonstradas na tabela abaixo (Tabela 4):

Tabela 4 – Lista dos animais silvestres que tiveram amostras coletadas, no CETAS-UFV.

Classe	Ordem	Nome Científico	Nome Vulgar	Quantidade
Aves	Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	3
Aves	Psittaciformes	<i>Pionus maximiliani</i>	Maritaca	62
Aves	Psittaciformes	<i>Primolius maracana</i>	Maracanã	4
Aves	Piciformes	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	2
Aves	Piciformes	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Araçari-castanho	1
Aves	Galliformes	<i>Penelope obscura</i>	Jacuaçu	1
Mamíferos	Artiodactyla	<i>Mazama gouazubira</i>	Veado-catingueiro	1
Mamíferos	Rodentia	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	3
Mamífero	Rodentia	<i>Cuniculus paca</i>	Paca	1
Mamíferos	Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	Quati	2
Mamíferos	Carnivora	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	8
Mamíferos	Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	1
Mamíferos	Carnivora	<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	3
Mamíferos	Carnivora	<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato mourisco	1
Mamíferos	Didelphimorphia (Marsupialia)	<i>Didelphis aurita</i>	Gambá-de-orelhas-pretas	3
Mamíferos	Primates	<i>Callithrix penicillata</i>	Mico-estrela	1
Mamíferos	Xenarthra	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	2
Mamíferos	Xenarthra	<i>Bradypus tridactylus</i>	Bicho-preguiça	1

6.2.2. Coleta de Amostras de Ectoparasitas

A coleta de amostras de ectoparasitas foi feita de 15 mamíferos. Os ectoparasitas e seus respectivos hospedeiros, além do estágio e classificação taxonômica dos carrapatos e pulgas coletados, encontram-se demonstrados abaixo (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Origem e classificação taxonômica dos carrapatos coletados no CETAS-UFV.

Origem da coleta (Animal e identificação)	Carrapatos (Classificação taxonômica e estádios)																				
	A. <i>cajennense</i>			A. <i>dubitatum</i>			A. <i>aureolatum</i>			A. <i>ovale</i>			A. <i>nodosum</i>			R. <i>sanguineus</i>			R. <i>(Boophilus) microplus</i>		
	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M	N	F	M
Capivara (M2)		X		X	X	X															
Capivara (M3)		X	X		X	X															
Capivara (M4)		X				X															
Quati (M6)												X									
Lobo-guará (M8)		X																			
Lobo-guará (M9)				X																	
Lobo-guará (M14)									X												
Jaguaririca (M16)																				X	
Gambá (M20)																	X				
Sagui (M23)	X																				
Tamanduá-mirim (M24)															X						
Tamanduá-mirim (M25)	X													X	X						
Cachorro-do-	X							X	X						X						

6.4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

Na PCR, foram testadas 130 amostras (sangue e ectoparasitas) para a detecção do gene do gênero *Rickettsia*. Dentre estas, quatorze foram positivas, conforme apresentado abaixo (Tabela 7 e 8):

Tabela 7 – Resultados positivos para amostras de sangue testadas para os *primers* CS-5 e CS-6 (gênero *Rickettsia*).

Animais (Nome Vulgar)	Animais (Nome Científico)	Identificação
Maritaca	<i>Pionus maximiliani</i>	A25
Maritaca	<i>Pionus maximiliani</i>	A35
Maritaca	<i>Pionus maximiliani</i>	A38
Veado - catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	M1
Gambá	<i>Didelphis albiventris</i>	M20
Lobo - guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	M10
Tamanduá - mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	M24
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	M2

Tabela 8 – Resultados positivos para amostras de ectoparasitas testadas para os *primers* CS-5 e CS-6 (gênero *Rickettsia*).

Origem do ectoparasita	Carrapatos (Nome Científico)	Identificação
Capivara (M4)	<i>Amblyomma dubitatum</i>	10b
Capivara (M4)	<i>Amblyomma cajennense</i>	10a
Capivara (M3)	<i>Amblyomma dubitatum</i>	11c
Cachorro – do – mato (M27)	<i>Amblyomma cajennense</i>	12a
Gambá (M20)	<i>Ctenocephalides canis</i>	P1
Lobo – guará (M15)	<i>Ctenocephalides canis</i>	P5

*P=Pulga

Estas mesmas amostras também foram testadas para o gene do gênero *Ehrlichia*. Das 130 amostras testadas, quatro amostras de sangue foram positivas para detecção molecular deste bioagente. Todas as amostras de ectoparasitas testadas para o gênero *Ehrlichia*, conforme protocolos descritos na sessão 5.2.2., apresentaram resultados negativos. A tabela abaixo nos mostra a identificação das

amostras e os resultados das mesmas para a detecção do gene ECC e ECB (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados positivos para amostras de sangue testadas para os *primers* (ECC e ECB) (gênero *Ehrlichia*).

Animais (Nome Vulgar)	Animais (Nome Científico)	Identificação
Maritaca	<i>Pionus maximiliani</i>	A49
Lobo - guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	M9
Lobo – guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	M12
Lobo - guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	M15

7. DISCUSSÃO

7.1. OCORRÊNCIA DE ECTOPARASITAS EM ANIMAIS SILVESTRES

7.1.1. Carrapatos

Os carrapatos da família Ixodidae, parasitam uma grande diversidade de hospedeiros incluindo quase todas as espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, inclusive o homem, aves, répteis e anfíbios (ARAGÃO, 1936). Além da espoliação direta e inoculação de toxinas, podem transmitir agentes patogênicos, comportando-se como vetores.

Em regiões Neotropicais já foi relatada a ocorrência de 57 espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, sendo no Brasil confirmada a existência de 33 dessas espécies, parasitando vários animais nos mais diferentes habitats (GUIMARÃES et al., 2001; BARROS-BATTESTI et al., 2006). As espécies de carrapatos encontradas nos mamíferos silvestres que foram coletados neste projeto pertencem aos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*.

Em tamanduás-mirim foram coletadas duas espécies de carrapatos, sendo estas *A. cajennense* e *A. nodosum* (Tabela 5). Labruna e cols, em 2002, observaram *A. cajennense* nesta espécie animal, em coletas no estado do Maranhão. Além disso, a ocorrência de ambas espécies em tamanduás-mirim foi relatada por Martins e cols. (2004), no estado do Mato Grosso.

Capivaras são frequentemente parasitadas por carrapatos das espécies *A. dubitatum* e *A. cajennense*. Fato que pode ser observado no presente estudo (Tabela 5), onde se constatou em capivaras o parasitismo por estas duas espécies de carrapatos. Resultados semelhantes foram obtidos por Labruna e cols. (2001) ao relatarem a ocorrência do *A. cajennense* em capivaras, e mais recentemente Labruna e cols (2004) ao relatarem e estudarem o ciclo do *A. dubitatum* neste mesmo animal.

Em jaguatirica foi coletada a espécie de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tabela 5). Em felídeos silvestres, a ocorrência da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi relatada por Horn, em 1983. Muitos estudos tem relatado infestações por *R. (Boophilus) microplus* em hospedeiros silvestres e domésticos, sendo que a maioria destes hospedeiros tem o histórico de partilhar a mesma área com bovinos (Labruna et al., 2001 a, b).

Em sagui foram coletados carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (Tabela 5), a presença do gênero *Amblyomma*, espécie *A. aureolatum*, parasitando primatas da espécie *Alouatta guariba* (bugio) foi registrada por Martins e cols. (2006), fato que reforça o parasitismo de primatas por carrapatos do gênero *Amblyomma*.

Em lobos-guará, as espécies de carrapatos encontradas durante a coleta foram *A. cajennense*, *A. aureolatum* e *A. dubitatum* (Tabela 5). Segundo Flechtmann (1990), o *A. aureolatum* encontra-se amplamente distribuído no território brasileiro, tendo sido observado o parasitismo em cães, cabras, bois,

gambás, veados, capivaras, quati e vários canídeos silvestres. A espécie *A. cajennense* foi relatada infestando cães de rua, na zona urbana de Lages, município de Santa Catarina (BELLATO et al., 2003).

As espécies de carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum*, coletadas de cachorro-do-mato (Tabela 5), já tiveram sua ocorrência relatada nestes canídeos. Em 2002, Labruna e cols., relataram a ocorrência da primeira espécie de carrapato, e Aragão e Fonseca (1961), relataram a ocorrência da segunda espécie de carrapato em cachorros-do-mato.

O parasitismo de gambás por carrapatos do gênero *Amblyomma* e *Ixodes* foi observado por Salvador e cols. (2007), além de outros pesquisadores. No presente estudo foi encontrado carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* parasitando gambá (Tabela 5), sendo possível afirmar o parasitismo desta espécie de mamífero por mais este gênero de carrapato.

Em quati foi encontrado carrapato da espécie *A. ovale* (Tabela 5). Segundo Guglielmone e cols. (2003), esta espécie de carrapato tem pouca ocorrência em canídeos silvestres, no entanto há a presença de relatos nesta ordem animal. Especificamente em quatis não foram encontrados relatos do parasitismo por esta espécie de carrapato, sendo possível afirmar que a espécie *A. ovale* parasita esta espécie animal.

7.1.2. Pulgas

Neste trabalho, a espécie de pulga encontrada nos animais silvestres, *C. canis*, é uma espécie relatada comumente em animais da ordem dos carnívoros. Em gambás foram encontradas pulgas da espécie *C. canis* (Tabela 5). Williams e cols. (1992) relataram o parasitismo pela espécie *C. felis* em gambás (*Didelphis marsupialis*), o que confirma o parasitismo por pulgas do gênero *Ctenocephalides* em gambás.

Em cachorro-do-mato, certificando o que foi relatado por Linardi & Guimarães (2000), foram encontrados exemplares de pulgas da espécie *C. canis*.

Em lobos-guará a espécie encontrada foi *C. canis* (Tabela 5), sendo que Gilioli e Silva (2000) já haviam relatado a ocorrência de *C. felis* nesta espécie animal.

Devido ao comportamento de busca característico dos animais, os animais domésticos podem desenvolver um papel peculiar como “hospedeiros-ponte” para a infestação de pulgas de diferentes animais silvestres, domésticos e seres humanos. Em mamíferos, estes ectoparasitas podem desempenhar diferentes papéis, atuando como vetores de patógenos ou como hospedeiros intermediários de parasitas (DOBLER & PFERFFER, 2011).

7.2. DETECÇÃO DE BIOAGENTES EM AMOSTRAS DE SANGUE

7.2.1. Gênero *Rickettsia*

No estudo realizado foram detectados oito animais infectados com *Rickettsia* sp., sendo três pertencentes à classe das aves e cinco à classe dos mamíferos (Tabela 7).

Os três espécimes pertencentes à classe das aves, positivos para as bactérias do gênero *Rickettsia*, são da espécie *Pionus maximiliani*, denominadas vulgarmente como maritacas (Tabela 7). Em estudos recentes no Brasil e no Reino Unido (OGRZEWALSKA et al, 2008; KARIN et al., 2010) foi constatada a importância do papel de aves migratórias (passeriformes) na expansão e distribuição da *Rickettsia* sp., incluindo espécies responsáveis pelas riquetsioses em humanos. Através da análise dos carrapatos coletados destes animais, por técnicas de biologia molecular, os resultados mostraram que as aves são competentes em transmitir riquetsias para os carrapatos que as parasitam. A detecção molecular de bactérias do gênero *Rickettsia* em amostras de sangue de aves ainda não foi relatada por pesquisadores, tampouco em aves pertencentes à família dos psitacídeos, sendo este o primeiro registro de detecção desta bactéria através de PCR nesta família.

Dentre a classe de mamíferos, cinco foram os indivíduos positivos para a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia*, no presente estudo (Tabela 7). Ao longo do tempo, muitas espécies silvestres como, antas, roedores, pássaros,

capivaras, serpentes, morcegos, peixes e gambás tem sido incriminadas como hospedeiros de agentes riquetsiais (DIAS & MARTINS, 1938; DIAS, 1939).

Um espécime de veado-catingueiro apresentou amostra positiva para detecção de bactérias do gênero *Rickettsia*. Nenhum relato de detecção molecular deste bioagente em amostras de sangue de veado-catingueiro foi encontrado, tampouco de outros cervídeos.

Em amostra de sangue de gambá também foi detectada a presença de bactérias deste gênero (Tabela 7). Nos estados de São Paulo e Minas Gerais, na década de 30, houve dois relatos de isolamento de bactérias deste gênero em gambás (*Didelphis spp.*) (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS, 1937). Na América do Norte, gambás (*Didelphis virginiana*) experimentalmente inoculados com *R. rickettsii* demonstraram desenvolvimento de riquetsemia com duração de 3 a 4 semanas após a inoculação do agente (BOZEMAN et al., 1967). Descobertas como as citadas anteriormente, tem levado muitos autores à suspeitar que gambás participam do ciclo natural de bactérias do gênero *Rickettsia*, agindo como hospedeiro - amplificador deste bioagente (DIAS & MARTINS, 1939; BOZEMAN et al, 1967; BOOSTROM et al, 2002).

Uma amostra de lobo-guará apresentou resultado positivo no teste molecular para detecção de riquetsias (Tabela 7). Canídeos são reconhecidamente suscetíveis à infecções por bactérias do gênero *Rickettsia* (HORTA et al., 2007), sendo relatada a infecção de cães domésticos por espécies como a *R. rickettsii* em regiões endêmicas no Sudeste do país (HORTA et al.,

2004; VIANA et al., 2008). Nos Estados Unidos da América, há relatos de casos sorológicos de riquetsioses em coiotes (família Canidae) (BISCHOF & ROGERS, 2005). Apesar de ainda não haver relatos de detecção molecular de bioagentes do gênero *Rickettsia* em lobos-guará, a ocorrência destes relatada em outros canídeos silvestres e domésticos, sustenta o resultado encontrado.

Em tamanduás-mirim, uma amostra de sangue foi positiva para a detecção de riquetsias (Tabela 7). Relatos de detecção molecular deste bioagente em amostras de sangue de xenarthras não foram encontradas, sendo esta a primeira nesta espécie animal.

Pacheco e cols. (2007), Souza e cols. (2008) e Fortes e cols. (2011) realizaram estudos sorológicos em capivaras no estado de São Paulo e Paraná, e relataram alta prevalência de bactérias do gênero *Rickettsia* nestes animais, o que sugere a circulação deste gênero de bactéria em capivaras nestes locais. Neste estudo foi observado uma amostra de capivara positiva para detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* (Tabela 7).

A detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* em vertebrados é normalmente um evento raro. A riquetsemia no animal infectado dura poucos dias ou semanas, e após isto nenhuma riquetsia é encontrada no sangue (BURGDORFER et al., 1988). Além disso, sabe-se que estas bactérias parasitam células endoteliais de vertebrados, dificultando ainda mais a detecção por análises moleculares, devido a baixa concentração no sangue (LA SCOLA & RAOULT, 1997)

7.2.2. Gênero *Ehrlichia*

No estudo realizado foram detectados quatro animais infectados com *Ehrlichia* sp., sendo um pertencente à classe das aves e três à classe dos mamíferos (Tabela 9).

A detecção molecular de bactérias do gênero *Ehrlichia* em amostras de sangue de aves ainda não foi relatada por pesquisadores, sendo este o primeiro registro de detecção desta bactéria através de PCR (Tabela 9). Em aves migratórias (passeriformes), foi feita a detecção molecular do DNA de bactérias do gênero *Ehrlichia* em carrapatos coletados destes animais, achados estes que reforçam a idéia de que as aves podem desempenhar um papel importante na dispersão destes bioagentes (BJOERSDORFF et al., 2001).

Na classe dos mamíferos, três amostras de lobos-guará foram positivas para a detecção molecular de bactérias do gênero *Ehrlichia*. No Brasil, Meneses e cols. (2008), no estado da Bahia, e Ueno e cols. (2009), no estado de São Paulo, registraram a alta taxa de infecção por bactérias deste gênero em cães domésticos, através de técnicas moleculares. Nos Estados Unidos da América, estudo realizado no Missouri demonstrou, através da detecção molecular, a presença de infecção em cães domésticos por bactérias deste gênero, sendo as espécies *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (LIDELL et al., 2003). Outro estudo molecular, realizado no estado da Virgínia, também detectou as mesmas espécies do gênero *Ehrlichia* causando infecção em cães domésticos. Infecção por bactérias do

gênero *Ehrlichia* já foram relatadas por testes sorológicos em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), em Israel (FISHMAN et al., 2004). Em canídeos silvestres brasileiros, Almeida (2011) detectou pela primeira vez, através de técnicas moleculares, bactérias do gênero *Ehrlichia* em cachorros-do-mato de vida livre (*Cerdocyon thous*).

7.3. DETECÇÃO DE BIOAGENTES EM AMOSTRAS DE ECTOPARASITAS

7.3.1. Detecção de *Rickettsia* sp. em Carrapatos e Pulgas

Dentre todos os ectoparasitas coletados, apresentaram resultado positivo seis *pools* de amostras, provenientes de seis animais diferentes (Tabela 8).

Três capivaras apresentaram três *pools* de amostras de carrapatos positivos, sendo esses carrapatos da espécie *A. cajennense* e *A. dubitatum* (Tabela 8). Pacheco e cols. (2007) observaram evidências sorológicas de infecção por *Rickettsia parkeri* e *R. bellii* em populações de capivaras de seis municípios do estado de São Paulo, sendo as populações de quatro municípios altamente infestadas por carrapatos da espécie *A. dubitatum*. Estudo mais recente, realizado por Pacheco e cols. (2009), demonstrou a presença de infecção por *R. bellii* em carrapatos de capivaras da espécie *A. dubitatum*, em 10 municípios amostrados do estado de São Paulo.

Em cachorro-do-mato, uma amostra contendo carrapatos da espécie *A. cajennense* apresentou resultado positivo na detecção molecular de bioagentes do

gênero *Rickettsia* (Tabela 8). Cardoso e cols. (2006) relataram a detecção molecular de *R. Rickettsii* em carrapatos da espécie *A. cajennense*, coletados de cães errantes no estado de Minas Gerais, demonstrando assim a importância de maiores estudos em canídeos silvestres e domésticos para se descobrir o real papel dos mesmos no ciclo deste bioagente.

Pulgas da espécie *C. canis*, coletadas de um gambá (*Didelphis albiventris*), apresentaram resultado positivo na detecção molecular de bactérias do gênero *Rickettsia* (Tabela 8). Em um estudo realizado nos EUA, na Califórnia, foi relatada a infecção de pulgas da espécie *C. felis*, coletadas em gambás (*Didelphis marsupialis*), por bactérias do gênero *Rickettsia* (*R. typhi*) (WILIAMS et al., 1992). Outro estudo realizado no Texas, EUA, registrou resultados positivos para a espécie *R. felis* e *R. typhi* em pulgas da espécie *C. felis*, coletadas de gambás (*Didelphis virginiana*). No Brasil, no estado de Minas Gerais, Oliveira e cols. (2002) detectaram pela primeira vez, através de testes moleculares, a infecção de pulgas do gênero *Ctenocephalides* por bactérias do gênero *Rickettsia*, espécie *Rickettsia felis*. O presente estudo, é o primeiro a detectar a presença de bactérias do gênero *Rickettsia* em pulgas da espécie *C. canis*, coletada de gambá (*Didelphis albiventris*), através de testes moleculares.

Amostra de pulgas da espécie *C. canis*, coletadas de um Lobo-guará, apresentaram resultado positivo na detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* (Tabela 8). Capelli e cols. (2009), realizaram um estudo com as espécies de pulga *C. felis* e *C. canis*, a primeira espécie coletada apenas em gatos domésticos e as duas espécies coletadas em cães domésticos. A detecção de bactérias do gênero

Rickettsia foi possível apenas na espécie *C. felis* de ambas espécies de animais, sendo encontrada a espécie de bactéria *R.felis*, assim o gênero *Ctenocephalides* apresentou positividade à detecção de riquetsias em canídeos, sustentando nosso resultado e demonstrando a relação desta bactéria com parasitas de canídeos.

8. CONCLUSÃO

- Os animais silvestres dos quais foram obtidas amostras positivas para detecção molecular dos bioagentes estudados, participam do ciclo de manutenção destas bactérias na natureza como reservatórios e potenciais amplificadores das mesmas. São necessários estudos mais aprofundados para definição do grau de participação destes animais silvestres neste ciclo, principalmente na definição das espécies de *Rickettsia* e *Ehrlichia* envolvidas.

- A coleta de ectoparasitas ampliou o conhecimento sobre a relação de parasitismo de algumas espécies de carrapatos nas espécies silvestres estudadas, fato que complementa o estudo da transmissão de bactérias e sugere novas relações patógeno-vetor-reservatório silvestre.

- Animais silvestres estudados no presente trabalho, originários da Zona da Mata Mineira, são reservatórios dos dois gêneros de bactérias investigados.

- Os protocolos utilizados com os *primers* citados, para detecção dos gêneros *Rickettsia* e *Ehrlichia*, mostraram-se adequados para a detecção destes microorganismos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I., PEDROZO, M.G.C. & BUENO, C. 2006. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em Cães Domésticos Procedentes da Reserva Florestal do Boqueirão, Município de Ingaí, Sul de Minas Gerais. *Arq. Inst. Biol.* 73(1):111-112.

ABRAMSON, J.S., GIVNER, L.B. 1999. Rocky Mountain spotted fever. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, 18(6):539-40.

ACHA, P.N. & SZYFRES, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2.ed. Washington: OPS/ OMS, 989 p.

ADANIA, C. H. 1998. Situação da população de felinos em cativeiro no Brasil. Curso de Extensão – felinos selvagens, Biotécnicas reprodutivas e conservação. Setor de Ciências Biológicas, UFPR: Curitiba-PR.

AGUIAR, D. M. et al. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 1, p. 126-132.

ALLSOP, B.A. 2010. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. *Veterinary Parasitology*, v. 167, p. 123-135.

ALMEIDA, A.P. 2011. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo.

ALMOSNY, N.R.P. 1998. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Seropédica, 202 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

ANDEREG, I.P. & PASSOS, F.M.L. 1999. Erliquiose canina: revisão. *Clínica Veterinária*,

v.4, n.18, p.31-38.

ANDERSON, B.E., SUMNER, J.W., DAWSON, J.E., TZIANABOS, T., GREENE, C.R., OLSON, J.G., FISHBEIN, D.B., OLSEN-RASMUSSEN, M., HOLLOWAY, B.P., GEORGE, E.H. 1992. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:775–780.

APANASKEVICH, D.A. & HORAK, I.G. 2008. Two new species of African *Haemaphysalis* ticks (Acari: Ixodidae), carnivore parasites of the *H. (Rhipistoma) leachi* group. *Journal of Parasitology* 94, 594-607.

ARAGÃO, H. 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.31, p.759-843.

ARAGÃO, H., FONSECA, F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, V. 59, p.115-148.

ARZUA, M., SILVA, M.A.N., FAMADAS, K.M., BEATI, L. & BARROS-BATTESTI, D.M. 2003. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Experimental and Applied Acarology*, Netherlands, 31: 283-296.

AZAD, A.F. & BEARD, C.B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p.179–186.

BACELLAR, F. 1996. *Rickettsias* isoladas em Portugal. Contribuição para a identificação e classificação de estirpes. Dissertação para obtenção de grau de Doutor em Biologia, Évora, v. 1, p. 325.

BARLETT, P.C., JUDGE, L.J. 1997. The role of epidemiology in public health. *Office International des Epizooties Scientific and Technical Review*, 16, 2:331-336.

BARROS-BATTESTI, D.N., ARZUA, M., BECHARA, J.H. 2006. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Butantan. 223p.

BELLATO, V., SARTOR, A.A., SOUZA, A.P., RAMOS, B.C. 2003. Ectoparasitos em caninos do município de Lages, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 95-98.

- BELONGIA, E.A., REED, K.D., MITCHELL, P.D., CHYOU, P.H., MUELLER-RIZNER, N., FINKEL, M.F., SCHRIEFER, M.E. 1999. Clinical and epidemiological features of early Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p.1472-1477.
- BIBERSTEIN, E.L., HIRSH, D.C. 2003. Agentes Rickettsiais de Doenças animais; as Riquetsias. In: HIRSH, D.C. & ZEE, Y.C. (Ed.). *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 273-275.
- BISCHOF R, ROGERS DG. 2005. Serologic survey of select infectious diseases in coyotes and raccoons in Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases*, 41: 787–91.
- BJOERSDORF, A., S. BERGSTROM, R. F. MASSUNG, P. D. HAEMIG, AND B. OLSEN. 2001. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerging Infectious Diseases* 7: 877–879.
- BOOSTROM A, BEIER MS, MACALUSO JA, MACALUSO KR, SPRENGER D, HAYES J, RADULOVIC S, AZAD AF 2002. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 549-554.
- BOZEMAN, F.M., SHIRAI, A., HUMPHRIES, J.W., FULLER, H.S. 1967. Ecology of Rocky Mountain spotted fever II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. *American Journal of Trop Medicine and Hygiene*, 16: 48-59.
- BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C., HANCOCK, S.I. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 9, p. 2645–2651.
- BURGDORFER, W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted Fever and scrub Typhus. D.H. Walker, *Biology of rickettsial diseases*, v. 1, p. 33-50.
- CALIC, S.B., GALVÃO, M.A.M., BACELLAR, F., ROCHA, C.M.B.M., MAFRA, C.L., LEITE, R.C., WALKER, D.H. 2004. Human ehrlichioses in Brazil: First suspect cases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8:259-262.
- CAPELLI, G., MONTARSI, F., PORCELLATO, E., MAIOLI, G., FURNARI, G., RINALDI, L., OLIVA, G., OTRANTO, D. 2009. *Parasit Vectors*, 2(Suppl 1): S8. Published online 2009 April 20.

- CARDOSO, L.D., FREITAS R.N., MAFRA C.L., NEVES C.V., FIGUEIRA F.C., LABRUNA M.B., GENNARI S.M., WALKER D.H. & GALVÃO MA. 2006. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 22(3):495-501.
- CHEN, D.Q., CAMPBELL, B.C., and PURCELL, A.H. 1996. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Current. Microbiology*, v. 33, p. 123-128.
- CHIARELLO, A. G. 1999. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, 89:71-82.
- CHOMEL, B.B., BELOTTO, A., MESLIN, F. 2007. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 23-25
- CORRÊA, S.H.R., PASSOS, E.C. 2001. Wild animals and public health. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa University Press, p. 493-499.
- COSTA Jr, L. M. C. et al. 2007. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *The Veterinary Journal*, 174: 673-676.
- CRISTOVA, I., SCHOULS, L., VAN DEPOL, I., PARK, J., PANAYATOV, S., LEFTEROVA, V., KANTARDDJIEV, T., DUMLER, J.S. 2001. High Prevalence os granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 4172-4174.
- CUBAS, Z. Z. 1996. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. *Rev. Sci. Tech.* 15: 267-287.
- CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. 2007. In: MANGINI e SILVA, 2007. Tratado de Animais Selvagens. 1.ed. São Paulo: Roca. 1354p.
- CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. 2007. In: VILANI, R.D.C., 2007. Tratado de Animais Selvagens. 1.ed. São Paulo: Roca. 1354p.
- DAGNONE, A. S., MORAIS, H. S. A., VIDOTTO, O. 2001. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina Agrárias*, v. 22, n. 2, p. 191-201, 2001.
- DAGNONE, A.S. 2001. Ehrlichioses nos animais e no homem. *Semina Agrárias*, Londrina, v. 22, n.2, p. 191-201.

DANTAS-TORRES, F. 2007. Rocky Mountain spotted fever. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, n. 11, p. 724-732.

DANTAS-TORRES, F. 2008a. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors* 1, 25.

DANTAS-TORRES, F. 2008b. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152, 173-185.

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

DAWSON, J.E., BIGGIE, K. L., WARNER, C. K., COOKSON, K. , JENKINS, S., LEVINE, J. F., AND OLSON, J. G. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from Southeast Virginia. *American Journal of Veterinary Research* 57: 1175–1179.

DAWSON, J.E., STALLKNECHT, E., HOWETH, E.W., WARNER, C., BIGGIE, K., DAVIDSON, W.R., LOCKHART, J.M., NETTLES, V.F., OLSON, J.G., CHILDS, J.E., 1994. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2725–2728.

DIAS, E. 1938. Depositários naturais e transmissores de febre maculosa Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*, v. 52, p. 269-272.

DIAS, E., MARTINS, A.V., 1939. Spotted Fever in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine*, v. 19, p. 103 -108.

DOBSON, A. & FOUFOPOULOS, J. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 356:1001-1012.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.J., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S. C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subject synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*, *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, n. 6, p. 2145-2165.

ELFVING, K., B. OLSEN, S. BERGSTROM, J. WALDENSTROM, A. LUNDKVIST, A. SJOSTEDT, H. MEJLON, AND K. NILSSON. 2010. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. *PLoS One*, 5:e8572.

FELDMAN, R. A., FREED, L. A., CANN, R. L. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, 4:663-673.

FISHMAN, Z., GONEN, L., HARRUS, S., STRAUSS-AYALI, D., KING, R., BANETH, G. 2006. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Veterinary Parasitology*, v. 26, p. 119-121.

FLECHTMANN, C.A.W. 1990. Ácaros de importância médico-veterinária. 3.ed. São Paulo: Nobel, 192 p.

FONSECA, G. A. B. 1985. The vanishing Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 34:17-34.

FORTES, E. 2004. Parasitologia veterinária. São Paulo: Ícone.

FORTES, F.S., SANTOS, L.C., CUBAS, Z.S., BARROS-FILHO, I.R., BIONDO, A.W., SILVEIRA, I., LABRUNA, M.B., AND MOLENTO, M.B. 2011. Anti-Rickettsia spp. Antibodies in free-ranging and captive capybaras from Southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11): 1014-1018.

FOWLER, M. E. (Ed.). 1986. Zoo and wild animal medicine. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders.

FOWLER, M. E. (Ed.). 1993. Zoo & wild animal medicine. 3.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 617p.

GALVÃO, M. A. M., 1996. Febre Maculosa em Minas Gerais: Um Estudo sobre a Distribuição da Doença no Estado e seu Comportamento em Área de Foco Peri-urbano. Tese de Doutorado, Belo Horizonte Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

GALVÃO, M. A. M., CHAMONE, C. B., CALIC, S. B., MACHADO, M. C., OTONI, M. E. A., DIETZE, R., MORON, C., FENG, H. M., OLANO, J. P. & WALKER, D. H., 1999. Serologic

evidence of spotted fever group *Rickettsia* in Novo Cruzeiro Municipality – Minas Gerais State – Brazil. In: *Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium* (D.Raoult & P. Brouqui, ed.), pp. 240-243, Marseille:Elsevier

GALVÃO, M.A., CALIC, S.B., CHAMONE, C.B., MAFRA, S.C.L., CESARINO FILHO, G., OLANO, J.P., WALKER, D.H. 2003. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 479-481.

GALVÃO, M.A., DUMLER, J.S., MAFRA, C.L., CALIC, S.B., CHAMONE, C.B., CESARINO FILHO, G., OLANO, J.P., WALKER, D.H. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1402-1405, 2003.

GILIOLI, R., SILVA, F.A. 2000. Frequency of parasites and *Salmonella* infection in captive maned-wolf, *Chrysocyon brachyurus*, kept in zoos at the State of São Paulo, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52: 337-341.

GILLESPIE, J.J., BEIER, M.S., RAHMAN, M.S., AMMERMAN, N.C., SHALLOM, J.M., PURKAYASTHA, A. et al. 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *Plos One*, v. 2, p. 266.

GODDARD, J., NOUMENT, B. R. 1986. Spotted fever group *rickettsiae* in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). *Journal of Medicine Entomology*, v. 23, p. 465-472.

GREENE, C.E. 2006. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis, p.41-47. In: Idem (ed.), *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 1387p.

GUEDES, E., LEITE, R.C., PRATA, M.C.A., PACHECO, R.C., WALKER, D.H., LABRUNA, M.B. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 841-845.

GUGLIELMONE, A.A., ESTRADA-PEÑA, A., MANGOLD, A.J., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B., MARTINS, J.R., VENZAL, J.M., ARZUA, M. & KEIRANS, J.E.. 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 113 (3-4): 273-288.

GUIMARÃES, J.H., TUCCI, E.C., BARROS-BATTESTI, D.M. 2001. *Ectoparasitos de Importância Veterinária*, Plêiade, São Paulo, 213 pp.

HORAK, I.G., CAMICAS, J.L. & KEIRANS, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology* 28, 27-54

HORN, S.C. 1983. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. Boletim Defesa Sanitária Animal., Brasília, v.17.

HORTA, M.C., LABRUNA, M.B., SANGIONI, L.A., VIANNA, M.C.B., GENNARI, S.M., GALVÃO, M.A., MAFRA, C.L., VIDOTTO, O., SCHUMAKER, T.T., WALKER, D.H. 2004. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 93-97.

HORTA, M.C., LABRUNA, M.B., PINTER, A., LINARDI, P.M, SCHUMAKER, T.T.S. 2007. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 793-801.

HORTA, M.C., LABRUNA, M.B., PINTER, A., LINARDI, P.M. & SCHUMAKER, T.T.S. 2007. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(7):793-801.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. 2005. *Biomás Brasileiros*. Brasília, DF: Autor. Acesso 19 de março de 2009, em: <http://www.ibama.gov.br>.

KAWAHARA, M. et al. 2009. *Ehrlichia chaffeensis* in Sick Deer, Nara Park, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 12, p. 1991-1993.

LA SCOLA, B., RAOULT, D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2715-2727.

LABRUNA, M.B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1166 :1, 156-166.

LABRUNA, M. B., McBRIDE, J.W., CAMARGO, L.M.A., AGUIAR, D.M., YABSLEY, M.J., DAVIDSON, W.R., STROMDAHL, E.Y., WILLIAMSON, P.C., STICH, R.W., LONG, S.W., CAMARGO, E.P., WALKER, D.H. 2007. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 189-195.

LABRUNA, M.B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of New York Academy Sciences*, v.1166, p. 156-166.

LABRUNA, M.B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of New York Academy Science*, 1166:156–66.

LABRUNA, M.B., JORGE, R.D.S.P., SANA, D.A., JÁCAMO, A.T.A., KASHIVAKURA, C.K., FURTADO, M.M., FERR, C., PEREZ, A.A., SILVEIRA, L., SANTOS JUNIOR, T.S., MARQUES, S.R., MORATO, R.G., NAVA, A., ADANIA, C.H., TEIXEIRA, R.H.F., GOMES, A.A.B., CONFORTI, V.A., AZEVEDO, F.C.C., PRADA, A.S., SILVA, J.C.R., BATISTA, A.F., MARVULO, M.F.V., MORATO, R.L.G., ALHO, C.J.R., PINTER, A., FERREIRA, P.M., FERREIRA, F. & BARROS-BATTESTI, D.M. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 36(1-2):149-163.

LABRUNA, M.B., KERBER, C.E., FERREIRA, F., FACCINI, J.L.H., DE WAAL, D.T., GENNARI, S.M. 2001a. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 97: 51-64.

LABRUNA, M.B., KERBER, C.E., FERREIRA, F., FACCINI, J.L.H., WAAL, D.T., GENNARI, S.M. 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 97: 1-14.

LABRUNA, M.B., PAULA, C.D., LIMA, T.F. & SANA, D.A. 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals from the Porto-Primavera Hydroelectric Power Station area, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97:1133-1136.

LABRUNA, M.B., PINTER, A., TEIXEIRA, R.H.F. 2004. Life-cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Experimental and Applied Acarology*, 32: 79-88.

LABRUNA, M.B., SOUZA, S.L.P., GUIMARÃES, J.R.J.S., PACHECO R.C., PINTER, A., GENNARI, S.M. 2001b. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53:

553-556.

LABRUNA, M.B., TERASSINI, F.A., CAMARGO, L.M.A., BRANDÃO, P.E., RIBEIRO, A.F. & ESTRADA-PEÑA, A. 2008. New reports of *Antricola guglielmonei* and *Antricola delacruzii* in Brazil, and a description of a new argasid species (Acari). *Journal of Parasitology* 94, 788-792.

LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T., HORTA, M.C., BOUYER, D.H., MCBRIDE, J.W., PINTER, A., POPOV, V., GENNARI, S.M., WALKER, D.H. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 90-98.

LAURENCE, W. F. & BIERREGAARD J.R. 1997. Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities. University of Chicago Press. 616 p.

LEE, M. et al. 2009. Natural co-infection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in a deer in South Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 71, n. 1, p. 101-103.

LEMOS, E.R.S. 2002. Rickettsial diseases in Brazil. *Virus Rev Res*, 7(1):7–16.

LEMOS, E.R.S. 2002. Rickettsial diseases in Brazil. *Virus Reviews and Research* 7: 7-16.

LIDDELL, A.M., STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A., SUMNER, J.W., PADDOCK, C.D., GAUDREAULT-KEENER, M., ARENS, M.Q., STORCH, G.A. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 4617-22.

LINARDI, P. M., GUIMARÃES, L. R. 2000. Siphonapteros do Brasil. Editora do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 291p.

LOPES, W.P., PAULA, A., SERVILHA, A.C. & F.S. ALEXANDRE. 2002. Composição da flora arbórea de um trecho de floresta estacional no jardim botânico da Universidade Federal de Viçosa (face Sudoeste), Viçosa, Minas Gerais. *R. Árvore*, Viçosa-MG, 26 (23):339-347.

MACHADO, R. Z. et al. 2006. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). *Veterinary Parasitology*, v. 139, n. 1-3, p. 262-266.

MAFRA, C. L. 2004. Febre Maculosa na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil – Relato

de caso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Ouro Preto, 13:361-361.

MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R. 1995. Principles and practices of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone.

MANHÃES, M.A. & LOURES-RIBEIRO, A. 2001. The avifauna of the Poço D'Anta Municipal Biological Reserve, Juiz de Fora, MG. *Biota Neotropical*, 11(3): Acesso em: 05/02/2012. Disponível em: <http://www.biotaneotropical.org.br/v11n3/en/abstract?inventory+bn01411032011>.

MARTÍNEZ, M.C., GUTIÉRREZ, C.N., MONGER, F., RUIZ, J., WATTS, A., MIJARES, V.M., ROJAS, M.G., TRIANA-ALONSO, F.J. 2008. *Ehrlichia chafeensis* in child. Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 519-520.

MARTINS, J.R., MEDRI, I.M., OLIVEIRA, C.M., GUGLIELMONE, A. 2004. Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 293-295.

MARTINS, J.R.; SALOMÃO, E.L.; DOYLE, R.L. et al. 2006. First record of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) parasitizing *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812) (Primata: Atelidae) in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, p.203-205.

MENDES, S.L. 2004. Workshop Floresta Atlântica e Campos Sulinos: Grupo de Mamíferos - Documento Preliminar. Disponível em: www.bdt.fat.org.br/workshop/mataatlantica/BR/rfinais/rt_mamiferos.

MENESES, I.D.S. et al. 2008. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 9, n. 4, p.770-776.

MILLAR B.C., XU, J., MOORE, J.E. 2003. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Current Issues Molecular Biology*, 9:21-40.

MITTERMEIER, R.A., MYERS, N., THOMSEN, J.B., FONSECA, G.A.B. & OLIVIERI, S. 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology*, 12(3):516-520.

- MONTALI, R.J.& MIGAKI, G. The comparative pathology of zoo animals. Washington: Smithsonian Institution, 1980. 684 p.
- MONTEIRO, J.L., FONSECA, F. 1932. Typho endêmico de S. Paulo XI. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, Brazil. 10:33–50.
- MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. 1935. Thypho exanthematico em Minas Gerais. *Brasil Médico*, v. 44, p. 465-470.
- MORENS, D.M., FOLKERS, G.K., FAUCI, A.S. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*; 430:242 - 249.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858.
- NAVA, S., GUGLIELMONE, A.A. & MANGOLD, A.J. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience* 14, 2857-2877.
- OGRZEWALSKA, M., PACHECO, R.C., UEZU, A., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. 2008. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. *Journal of Medical Entomology*, v. 45, n. 4, p. 770-774.
- OLANO, J. P. et al. 2003. Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 12, p. 1579-1586.
- OLIVEIRA, L.S. 2008. Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos de Viçosa/MG. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola.
- OLIVEIRA, P.R. 2000. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 92: 295-301.
- OLIVEIRA, P.R. 2004. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Ouro Preto, 13:118-122.
- OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. C.;

SILVA, S. U. & WALKER, D. H., 2002. *Rickettsia felis* in Ctenocephalides spp. Fleas, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8:317-319.

PACHECO, R.C. 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *R. parkeri*. *Biomedica*, v.27, p. 841-845.

PACHECO, R.C., HORTA, M.C., PINTER, A., MORAES-FILHO, J., MARTINS, T.F., NARDI, M.S., SOUZA, S.S.A., SOUZA, C.E., SZABÓ, M.P.J., RICHTZENHAIN, L.J. & LABRUNA, M.B. 2009. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42:351-353.

PARKER, R. R. 1940. A pathogenic rickettsia from the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. *Proceedings of the Third International Congress of Microbiology*, 2–9 September 1939, New York. 390-391. American Society of Microbiology New York.

PEREZ, M. et al. 2006. Human Infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 110-117.

PERKINS, S.L., OSGOOD, S. M., SCHALL, J.J. 1998. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria. Implications for epizootiology. *Molecular Ecology*, 7:1587-1590.

PINTER, A., LABRUNA, M.B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of New York Academy Science*, 1078:523-9.

PIZA, J.T. 1932. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. In: Piza JT, Meyer JR, Salles Gomes L, editors. tifo exantemático de São Paulo. São Paulo (Brasil): Sociedade Imprensa Paulista, p. 11–119.

PRAKASAN, K. & RAMANI, N. 2007. Two new species of ixodid ticks (Acarina: Ixodida) from Kerala, India. *International Journal of Zoological Research* 3, 169-177

RAOULT, D., FOURNIER, P.E., FENOLLAR, F., JENSENIUS, M., PRIOE, T., DE PINA, J.J., CARUSO, G., LAFERL, H., ROSENBLAT, J.E., and MARRIE, T.J. 1996. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *New England Journal of*

Medicine, 344:1504-1510.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S. 2005. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.*, 130:261-267.

RICKETTS, H.T. 1906. The study of Rocky Mountain spotted fever by means of animals inoculations. *JAMA*, v. 47, p.33-36.

RODANICHE, E.C. 1953. Natural infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.2, p. 696-699.

SAHNI S.K., RYDKINA E. (2009). Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. *Future Microbiology*, v. 4, 323-339.

SAHNI S.K., RYDKINA E. 2009. Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. *Future Microbiology*, v. 4, p. 323-339.

SALVADOR, C.H., CARVALHO-PINTO, C., CARVALHO, R., GRAIPEL, ME. and SIMÕES-LOPES, PC. 2007. Interação parasito-hospedeiro entre ectoparasitos (Ixodida and Siphonaptera) e gambás *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphimorphia), no continente e em ilhas do litoral de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biot.*, vol. 20, no. 4, p. 81-90.

SEDGWICK, C.J., ROBINSON, P.T., LOCHNER, F. K. 1975. Zoonoses: a zoo's concern. *Journal American Veterinary Medical Association*, 167(9):828-829.

SIEMERING, H. 1986. Zoonoses. In: FOWLER, M.E. (Ed.). *Zoo & wild animal medicine*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.63-68.

SILVA, J.C.R., OGASSAWARA, S., ADANIA, C.H., FERREIRA, F., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., FERREIRA NETO, J.S. 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 102:217-224.

SILVA, L.J., GALVÃO, M.A.M. 2004. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 13 (Supl.): 197-198.

SKOTARCZAK, B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Annals of Agricultural and Environmental*

Medicine, v. 10, n. 2, p. 137-141.

SLOSS, M.W, ZAJAC, A.M, KEMP, R.L. 1999. Parasitologia Clínica Veterinária. Editora Manole. 6ª edição. p. 134-135.

SMITH C. J. & OSBORN A. M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67:6–20.

SOUZA, C.E., CALIC, S.B., CAMARGO, M.G.O., SAVINI, E.S.M., SOUZA, S.S.A.L., LIMA, V.L.C., NETO, E.J.R., YOSHINARI, N.H. 2004. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(Supl.):203-205.

SOUZA, C.E., SOUZA, S.S.L., LIMA, V.L.C., CALIC, S.B., CAMARGO, M.C.G., SAVANI, E.S.M.M., D'AURIA, S.R.N., LINHARES, A.X., YOSHINARI, N.H. 2008. Serological identification of Rickettsia spp. From the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas –SP-Brazil. *Ciência Rural*, v.38, n. 6, p. 1694-1699.

SWANSON, F.W. 1998. Curso de Extensão – felinos selvagens, Biotécnicas reprodutivas e conservação. Setor de Ciências Biológicas, UFPR: Curitiba-PR.

SZABÓ, M.P.J., CUNHA, T.M., PINTER, A., VICENTINI, F. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 25(10-11):909-916.

SZABÓ, M.P.J., LABRUNA, M.B., GARCIA, M.V., PINTER, A., CASTAGNOLLI, K.C., PACHECO, R.C., CASTRO, M.B., VERONEZ, V.A., MAGALHÃES, G.M., VOGLIOTTI, A. & DUARTE, J.M.B. 2009. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103(1):57-72.

SZABÓ, M.P.J., OLEGÁRIO, M.M.M. & SANTOS, A.L.Q. 2007. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Experimental and Applied Acarology*, 43(1):73-84.

THRALL, M.A., BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTMAN, M.J., LASSEN, E.D., REBAR, A., WEISER, G. 2007. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1.ed. São Paulo: Roca. 582p.

TRAPP, S. M. et al. 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a

hospital population. *Veterinary Parasitology*, v. 140, n. 3-4, p. 223-230.

TRAVASSOS, J. 1937. Identification d'un virus semblable a celui du " Typhus exanthématique de Sao Paulo ", isolé de la sarigue marsupiale (*Didelphis paraguayensis*). *Compt Rend Soc Biol*, 126: 1054-1056.

UENO, T.E.H. et al. 2009. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 3, p. 57-61.

VENZAL, J.M., ESTRADA-PEÑA, A., MANGOLD, A.J., GONZÁLEZ-ACUÑA, D. & GUGLIELMONE, A.A. 2008. The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* species group (Acari: Ixodida: Argasidae): description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp. From southern South America. *Journal of Medical Entomology* 45, 832-840.

VIANNA, M.C.B. et al. 2008. Rickettsial Spotted Fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, n. 5, p. 297-301.

VIEIRA, R.F.C., BIONDO, A.W., GUIMARÃES, M.S., SANTOS, A.P., SANTOS, R.P., DUTRA, L.H., DINIZ, P.P.V.P., MORAIS, H.A., MESSICK, J.B., LABRUNA, M.B., VIDOTTO, O. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. Jaboticabal. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* vol. 20, nº1.

WALKER, D.H. 1989. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. *Clinical Microbiology*, v. 2, p. 227-240.

WALKER, D.H. 2007. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clinical infectious of Diseases*, v. 45 (Suppl.1): S39-S44.

WALKER, D.H. and DUMLER, J. S. 1997. Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 121, p. 785-791.

WALKER, D.H., ISMAIL, N., OLANO, J.P., MCBRIDE, J.W., YU, X.J., FENG, H.M. 2004. *Ehrlichia chaffeensis*: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v. 115, p.375-382.

WALKER, D.H., ISMAIL, N., OLANO, J.P., MCBRIDE, J.W., YU, X.J., FENG, H.M. 2004.

Ehrlichia chaffeensis: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 115:375-382.

WEINHOLD, B. 2003. "Conservation Medicine": Environmental Health Perspectives 111, 525-529

WILLIAMS, S. G., SACCI JR., J.B.M., SCHRIEFER, E., ANDERSON, E. M., FUJIOKA, K. K., SORVILLO, F. J., BARR, A. R., AND AZAD, A. F. 1992. Typhus and typhus-like rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:1758-1762.

YABSLEY, M. J. 2010. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis*: vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries, *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 136-148.

YABSLEY, M. J. et al. 2002. *Ehrlichia ewingii* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 7, p. 668-671.