

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA

Fernanda Cunha Boer

**PESQUISA DE AGENTES ZONÓTICOS TRANSMITIDOS POR
CARRAPATOS EM ANIMAIS SILVESTRES ATROPELADOS EM
RODOVIAS BRASILEIRAS**

São Paulo

2024

FERNANDA CUNHA BOER

Pesquisa de agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos em animais silvestres atropelados em rodovias brasileiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Única da Universidade Santo Amaro - UNISA, para obtenção do título de Mestre em Saúde Única.

Orientadora: Prof. Dra. Valeria Castilho Onofrio

São Paulo

2024

B658p

Boer, Fernanda Cunha.

Pesquisa de agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos em animais silvestres atropelados em rodovias brasileiras / Fernanda Cunha Boer. – São Paulo, 2024.

65 p. : il., color.

Orientadora: Valeria Castilho Onofrio.

Dissertação. (Mestrado Stricto Sensu em Saúde Única) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Rickettsia. 2. Anaplasmatidae. 3. Piroplasmida. 4. Hepatozoon. 5. Carrapatos. 6. Animais Silvestres. I. Onofrio, Valeria Castilho, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 636.089

Dedico este trabalho àqueles que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todas as etapas da minha vida, meus pais José Luiz Boer e Ana Maria da Cunha e ao meu querido irmão Luiz Fernando Boer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela força e pela graça da vida, sendo meu pilar de fé e coragem para enfrentar todos os obstáculos.

Aos meus pais, José Luiz e Ana Maria, por serem minha base e sempre estarem ao meu lado me incentivando e me apoiando nos demais projetos de vida.

Ao meu irmão, Luiz Fernando, pela amizade e carinho e por ser sempre meu maior companheiro de aventuras.

À Prof^a. Dr^a. Valeria Castilho Onofrio pela confiança, pelas experiências compartilhadas e por ter me aceitado como orientada.

Ao Prof^o. Dr. Herbert Sousa Soares pela parceria e orientações.

A Fernanda Delborgo Abra e Paula Ribeiro Prist, da empresa Via Fauna, pela doação das amostras biológicas utilizadas neste estudo.

A todos meus colegas e amigos de pós-graduação, em especial: Camylla Pereira e Ágatha Ferreira pela amizade, companheirismo e risadas durante esses anos.

A todos os professores da pós-graduação da Universidade Santo Amaro que contribuíram grandiosamente para minha formação.

Ao querido da graduação Prof^o. Dr. Celso Martins Pinto, que foi o primeiro a abrir oportunidades para mim no mundo da medicina veterinária, por todo ensinamento, incentivo e por acreditar no meu potencial.

À CAPES pela bolsa de estudo (Processo nº 88887.705300/2022-00).

Por fim, agradeço a todos que, diretamente ou indiretamente, fizeram parte dessa jornada.

Resumo

A antropização em habitats naturais é uma das principais causas da perda da biodiversidade, fazendo com que ocorra profundas mudanças nesses ambientes. Dentre essas mudanças, umas das que gera importante impacto ambiental é a implantação de rodovias, que leva ao desmatamento e conseqüentemente a uma alteração da paisagem natural. A construção de rodovias gera impactos diretos sobre a vida selvagem modificando a estrutura e dinâmica dos ecossistemas. O atropelamento de animais silvestres é a principal causa de mortalidade de vertebrados por meio de ação antrópica. Um dos fatores que aumentam a demanda de novas estradas é o crescimento das cidades, sendo, portanto, necessária a interligação entre elas e a construção de vias de transporte para pessoas e cargas, resultando em impactos ecológicos severos, bem como a aproximação dos animais silvestres com o homem e os animais domésticos. O presente estudo teve por objetivo investigar a presença de possíveis agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos em animais silvestres atropelados em rodovias no Estado de São Paulo. Dos 11 animais que apresentaram ectoparasitos, dez estavam infestados exclusivamente por carrapatos e um por carrapato e piolhos. A quase totalidade dos animais que apresentaram ectoparasitos eram mamíferos, com exceção de uma ave da espécie *Cariama cristata*. Foram coletados carrapatos das espécies *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus microplus* e um piolho da espécie *Solenopotes binipilosus*. Amostras de tecidos de 33 dos 36 animais testados foram positivas para a presença de DNA de hemoparasitas da ordem Piroplasmida, cinco para o gênero *Hepatozoon* e somente uma para a família Anaplasmataceae. Todas as amostras foram negativas quanto à presença de DNA de *Rickettsia*

Palavras-chave: *Rickettsia*, Anaplasmataceae, Piroplasmida, *Hepatozoon*, carrapatos, animais silvestres.

Abstract

Anthropization of natural habitats is one of the main causes of biodiversity loss, causing profound changes in these environments. Among these changes, one that generates an important environmental impact is the implementation of highways, which leads to deforestation and consequently an alteration of the natural landscape. The construction of highways generates direct impacts on wildlife, modifying the structure and dynamics of ecosystems. The running over of wild animals is the main cause of vertebrate mortality through human action. One of the factors that increase the demand for new roads is the growth of cities, therefore requiring interconnection between them and the construction of transport routes for people and cargo, resulting in severe ecological impacts and bringing wild animals closer to the man and domestic animals. The present study aimed to investigate the presence of possible zoonotic agents transmitted by ticks in wild animals run over on highways in the State of São Paulo. Of the 11 animals that presented ectoparasites, ten were infested exclusively by ticks and one by ticks and lice. Almost all of the animals that presented ectoparasites were mammals, with the exception of one bird of the species *Cariama cristata*. Ticks of the species *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus microplus* and a louse of the species *Solenopotes binipilosus* were collected. Tissue samples from 33 of the 36 animals tested were positive for the presence of DNA from hemoparasites of the order Piroplasmida, five for the *Hepatozoon* genus and only one for the Anaplasmataceae family. All samples were negative for the presence of *Rickettsia* DNA.

Keywords: *Rickettsia*, Anaplasmataceae, Piroplasmida, *Hepatozoon*, ticks, wild animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estado da cobertura vegetal remanescente no bioma Mata Atlântica em 2022.....	17
Figura 2. Ocorrência de supressão de vegetação nativa no período de agosto/2022 a julho/2023	18
Figura 3. Mapa com a localização dos pontos de coleta nas rodovias onde os animais atropelados foram encontrados.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de animais silvestres encontrados atropelados nas rodovias.....	30
Tabela 2. Espécies de carrapatos e piolhos coletados de animais silvestres atropelados nas rodovias SP-225, SP-327 e SP-270 no estado de São Paulo.....	38
Tabela 3. Resultados da detecção molecular pela PCR de protozoários da ordem Piroplasmida e gênero <i>Hepatozoon</i> , e bactérias da família Anaplasmataceae e gênero <i>Rickettsia</i> em sangue e tecidos coletados de animais silvestres atropelados nas rodovias SP-225, SP-327 e SP-270 no estado de São Paulo.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	111
1.1 Saúde Única.....	13
1.2 Fauna silvestre.....	144
1.3 Bioma Mata Atlântica.....	155
1.4 Bioma Cerrado-Paulista.....	166
1.5 Parasitismo.....	18
1.6 Carrapatos.....	20
1.7 Agentes patogênicos.....	21
1.7.1 Ordem Piroplasmida.....	221
1.7.2 Família Anaplasmataceae.....	22
1.7.3 Gênero <i>Hepatozoon</i>	265
1.7.4 Gênero <i>Rickettsia</i>	26
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	28
3.1 Área de coleta.....	28
3.2 Obtenção, armazenamento e conservação das amostras.....	28
3.3 Identificação dos ectoparasitos.....	29
3.4 Extração de DNA.....	29
3.5 Quantificação do DNA.....	31
3.6 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	31
3.6.1 <i>Rickettsia</i>	31
3.6.2 Família Anaplasmataceae.....	32
3.6.3 <i>Hepatozoon</i>	32
3.6.4 Ordem Piroplasmida.....	33
3.7 Leitura e análise dos produtos da PCR.....	35
3.8 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos.....	35
3.9 Análise das sequências.....	36
3.10 Análises filogenéticas.....	36
4. Resultados.....	37
4.1 Ectoparasitos coletados.....	37
4.2 Amostras de sangue e tecidos.....	39
5. Discussão.....	42
6. Considerações finais.....	46
7. Referências bibliográficas.....	47

1. INTRODUÇÃO

O avanço humano em habitats naturais é uma das principais causas da perda da biodiversidade (CEBALLOS et al., 2015), alterando significativamente os ambientes naturais (FICETOLA, MAZEL, & THUILLER, 2017). Nas regiões tropicais ocorre uma perda global de biodiversidade devido as atividades humanas (GIBBS et al., 2010).

Dentre as atividades que causam grande impacto no ambiente natural, temos a implantação de rodovias como grande modificadora, gerando uma alteração da paisagem natural em razão do desmatamento, aproximadamente 85% da perda da vegetação ocorre em até cinquenta quilômetros do limite das rodovias (DOMINGUES, 2014).

As estradas/rodovias desenvolvem função essencial quanto ao desenvolvimento econômico do país, servindo de conexão entre cidades/estado para execução de logística de modo geral. Entretanto, a construção viária gera impactos significativos no ambiente natural, causando antropização de ambientes, segregação de espécies, devendo ser realizado estudo sério e complexo para minimização desses impactos ambientais.

Conforme previsão do CONAMA (BRASIL, 1986a, p. 636):

Art. 1. [...] considera-se impacto ambiental qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam:

I - a saúde, a segurança e o bem-estar da população;

II - as atividades sociais e econômicas;

III- a biota;

IV - as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente;

V - a qualidade dos recursos naturais.

As rodovias geram impactos diretos sobre a vida selvagem, modificando a estrutura e dinâmica dos ecossistemas desses animais, como, por exemplo, o aumento das colisões com veículos durante seus processos naturais de deslocamento (PEÑA & DRUMMOND, 1999; AVELAR et al., 2015).

Assis e Furlan (2014), definiram como os principais efeitos e impactos causados pelas rodovias:

[...] efeitos diretos (mortalidade da fauna por atropelamento, poluição) e efeitos indiretos (perda e fragmentação de habitats, alterações microclimáticas, facilitação de invasões por espécies exóticas) que influenciam a permeabilidade da paisagem aos fluxos da biota, restringindo a movimentação de animais e isolando populações de organismos. As estradas também alteram a qualidade das águas e do ar e afetam as comunidades humanas.

O atropelamento de animais silvestres é a principal causa de mortalidade de vertebrados por meio de ação antrópica (COSTA, 2014). Uma estimativa parcial do Sistema Urubu¹, indica que 15 animais morrem nas estradas brasileiras a cada segundo. Segundo estimativas do Centro Brasileiro de Ecologia de Estradas, todos os anos 475 milhões de animais silvestres morrem nas estradas brasileiras vítimas de atropelamento.

¹ Sistema Urubu – aplicativo criado em 2014 para conservação da biodiversidade e termômetro de índice de atropelamento de fauna nas estradas brasileiras

Segundo Cymbaluk (2018), estimativas feitas Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas (CBEE), discorre que os pequenos vertebrados são os que mais sofrem com atropelamentos, seguidos por animais de médio e grande porte, ainda, há estimativa de cerca de 56,4% dos casos de atropelamento seja na região sudeste.

Com o crescimento da população e das cidades, aumenta-se a demanda de novas estradas, havendo necessidade da interligação entre elas e a construção de um meio de transporte para pessoas e cargas.

Ainda que benéficas e necessárias à população humana, estas modificações resultam em impactos ecológicos severos (TROCME, 2003; LAURENCE et al., 2014).

1.1 Saúde Única

O conceito de Saúde Única ou One Health (OH), foi proposto por organizações internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), reconhecendo o vínculo estreito entre o ambiente, as doenças em animais e a saúde humana, uma vez que as interações entre humanos e animais podem ocorrer em diferentes ambientes e de diversas maneiras.

Em declaração, a Organização Mundial de Saúde (2022), versou sobre abordagem integrativa e unificadora, objetivando a melhoria de forma sustentável da saúde humana, animal e ambiental. Tal abordagem se dá de forma multidisciplinar e multisetorial, movimentando os vários setores relacionados à saúde do homem, animais e dos ecossistemas para trabalharem de forma conjunta e mitigar as ameaças à saúde pública (SHRESTHA, et.al., 2018).

Segundo a Segundo a OIE, cerca de 60% das doenças humanas têm em seu ciclo a participação de animais, portanto, são zoonóticas, assim como 70% das doenças emergentes e reemergentes.

O Conselho Federal de Medicina Veterinária entende a Saúde Única como uma visão integrada e indissociável entre saúde humana, animal e ambiental. Atualmente, a Medicina Veterinária é uma das profissões com maior campo de

atuação em Saúde Única no Brasil e no mundo, uma vez que o médico veterinário atua na inspeção e fiscalização de produtos de origem animal, pesquisas de tecnologias de produção, estudos de medidas de saúde pública relativas às zoonoses e manejo ambiental. O Conselho Nacional de Saúde incluiu a Medicina Veterinária no rol das profissões de saúde, pela Resolução CNS nº 287/1998.

Ainda amparado pelo CFMV, OIE, OMS e FAO, o médico-veterinário também está inserido na Atenção Básica, por ser uma das profissões que podem compor os Núcleos Ampliados de Saúde da Família e Atenção Básica (NASF-AB), podendo atuar nas Vigilâncias Sanitária, Epidemiológica e de Zoonoses, de Doenças Transmitidas por Vetores e Saúde do Trabalhador ou ainda em situações de transformações drásticas como no caso de desastres ambientais.

Um dos fatores mais prováveis para explicar o aumento na ocorrência de novas doenças é a expansão da população humana e consequente aproximação do homem com animais silvestres/selvagens (PANDA, 2008). Há, ainda, a preocupação com o rápido aumento da urbanização, como apresentado em um estudo publicado em 2019, que mostra um aumento de 39% em 1980, para 46% em 1997, e prevê que até 2030 ele seja de 60%, indicando uma grande elevação da densidade humana nos centros urbanos (CUTLER, 2019).

Não obstante o aumento da população humana, outros fatores globais favoreceram a emergência de agentes de doenças zoonóticas, como: comércio e viagens, mudanças no habitat, terrestre, poluição e expansão da produção animal. Sobre o problema, Lomazzi et al. (2019), observam que “os desafios globais de saúde pública não são lineares e [...] são necessárias abordagens multifacetadas e com várias partes interessadas”.

1.2 Fauna silvestre

O Brasil, conhecido por sua enorme biodiversidade de fauna e flora tem sofrido ao longo das últimas décadas grandes devastações ambientais, afetando severamente seu ecossistema. O contato cada vez mais próximo do homem e animais domésticos com a fauna silvestre tem causado grande impacto na saúde como um todo, levando a emergência ou reemergência de doenças, incluindo as de caráter zoonótico, ao aumento da circulação dessas doenças em populações

suscetíveis e conseqüentemente sua disseminação para novas regiões geográficas (BARLETT; JUDGE, 1997).

A proximidade destas populações acaba favorecendo a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, instituindo novas relações parasitárias e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão das doenças (CORRÊA e PASSOS, 2001). Estudos epidemiológicos são fundamentais para um melhor entendimento sobre os focos de ocorrência e comportamento das doenças, sendo possível o mapeamento dos fatores de risco e da circulação dos agentes nos animais silvestres.

A fauna silvestre pode servir como uma valiosa fonte de informações em novos locais de estudo, pois podem ser considerados como bioindicadores da qualidade e saúde ambiental. Alguns de seus representantes atuam como reservatórios e/ou hospedeiros amplificados de agentes que, em grupos de indivíduos suscetíveis, podem se tornar patogênicos e causadores de doenças ainda desconhecidas (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2001).

Além do fato de alguns grupos de agentes já terem sido incriminados como causa da diminuição, ou até mesmo extinção de populações silvestres, o que evidencia a importância do monitoramento da saúde dessas espécies (DEEM et al., 2001; CLEVELAND et al., 2002).

1.3 Bioma Mata Atlântica

No Brasil, existem seis domínios reconhecidos com características ecológicas únicas: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (CÂMARA et al. 2015). Dois desses domínios, Mata Atlântica e Cerrado, são considerados como “hotspots” de biodiversidade por possuírem muitas espécies endêmicas e emblemáticas, e por terem sido fortemente impactado por ações antrópicas (MITTERMEIER et al. 2005)

O bioma Mata Atlântica ocupa cerca de 13% do território brasileiro e compreende a região costeira do Brasil, indo dos estados do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Contribui com 70% do faturamento bruto do produto interno (PIB) e 2/3 da economia industrial (MARTINELLI et al. 2013).

A Mata Atlântica é uma das florestas tropicais mais ameaçadas do planeta (SAFAR; MAGNAGO; SCHAEFER, 2020). Atualmente, esse bioma vem sendo

devastado com o processo de urbanização (FERREIRA et al., 2019), com cerca de 60% da população brasileira residindo em área de domínio desse bioma (SCARANO; CEOTTO, 2015).

Segundo dados de pesquisa da ONG SOS Mata Atlântica², hoje restam apenas 24% da cobertura florestal original, sendo apenas 12,4% de florestas maduras e bem preservadas (Figura 1). Esse bioma é composto por variados ecossistemas florestais e por uma biodiversidade semelhante à do bioma Amazônia.

Entre os meses de outubro de 2021 e de 2022, a Fundação SOS Mata Atlântica e o INPE observaram o desflorestamento de 20.075 hectares (ha) do bioma, o correspondente a mais de 20 mil campos de futebol de futebol em um ano ou um Parque Ibirapuera (SP) desmatados a cada três dias. Protegido por uma lei especial (Lei 11.428, de 22 de dezembro de 2006), desde o lançamento do Atlas dos Remanescentes Florestais esse bioma vem sendo monitorado por imagens de satélite.

No último levantamento feito pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, este bioma contava com aproximadamente 850 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 270 espécies de mamíferos e 350 espécies de peixes (BRASIL. MMA, 2018 – Mata Atlântica). Cerca de 39% dos mamíferos desse bioma são endêmicos.

1.4 Bioma Cerrado-Paulista

O Cerrado é um dos biomas mais ameaçados do nosso território. Foi criado o Mosaico de Unidades de Conservação do Cerrado Paulista, que abrange o Refúgio de Vida Silvestre (RVS) Aimorés e a Área de Relevante Interessante Ecológico (ARIE) Leopoldo Coutinho, localizados nos municípios de Bauru, Pederneiras e Agudos, no centro-oeste paulista, tornando-se o segundo maior conjunto protegido do cerrado paulista em termos de área, com 4.035 hectares no total.

A vegetação do cerrado não possui uma fisionomia uniforme, ela se modifica em toda sua extensão. Bastante diversificada apresenta desde campos abertos até formas relativamente densas. Esta diferença se dá pela qualidade

² SOS Mata Atlântica – organização não-governamental criada em 1986

de solo, mais férteis ou menos férteis, bem como pela irregularidade dos regimes e características das queimadas de cada local (frequência, época, intensidade). Então, ainda que o bioma do cerrado se distribua predominantemente em áreas de clima tropical sazonal, os fatores que aí limitam a vegetação são outros: a fertilidade do solo e o fogo (Coutinho in Klein, 2002, p. 82).

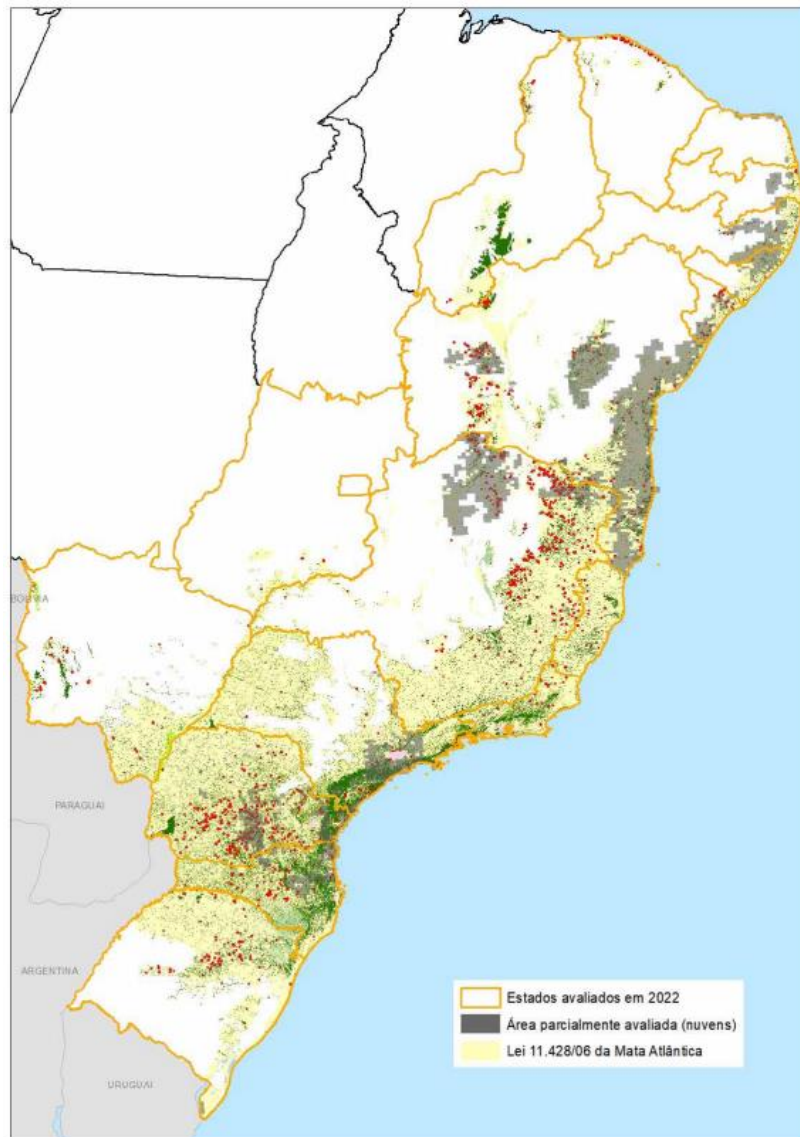


Figura 1: Estado da cobertura vegetal remanescente no bioma Mata Atlântica em 2022. Fonte: SOS Mata Atlântica

Este bioma é uma das áreas que abriga a maior diversidade biológica do planeta, sendo considerado um “hotspot” mundial de biodiversidade em razão

das ameaças sobre ele incidentes e por configurar prioridade para conservação ambiental.

No estado de São Paulo, a área remanescente de cerrado corresponde a apenas 8,5% de sua superfície original. E do conjunto das unidades de conservação estaduais paulistas de proteção integral, apenas 2% aproximadamente correspondem a fisionomias do cerrado. Há ainda uma zona

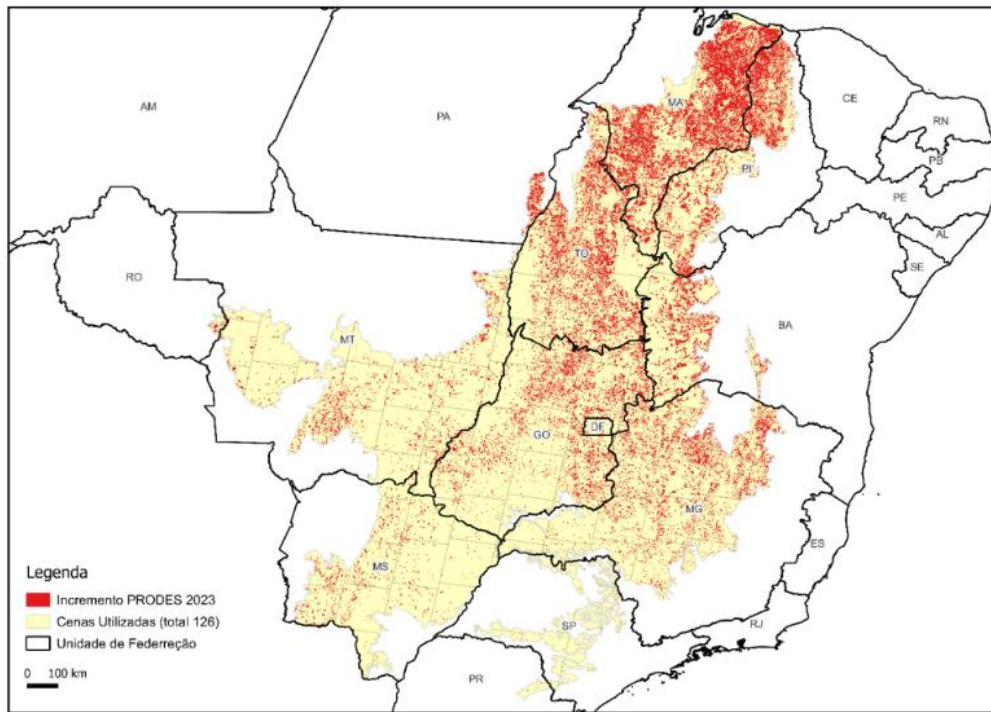


Figura 2: Ocorrência de supressão de vegetação nativa no período agosto/2022 a julho/2023.
Fonte: INPE

de transição entre os dois biomas, algo chamado também de zona de tensão, previsto pela resolução SMA-146, de 8/11/2017. Trata-se de uma zona com características específicas, que abrangem uma diversidade de espécies, sendo em grande parte áreas consideradas como unidades de conservação e de proteção integral (UCs).

1.5 Parasitismo

Considerando, ainda, este contato cada vez mais próximo dos animais silvestres com o homem e animais domésticos, a transmissão de agentes patogênicos e a ocorrência de doenças se tornam cada vez mais presentes (BARLETT; JUDGE, 1997). Com relação aos parasitos, essa maior interação

pode levar a sua dispersão e aumento do seu nicho ecológico, consequentemente alterando a dinâmica da relação com seus hospedeiros (CORRÊA; PASSOS, 2001).

Por definição, 'parasito' é todo organismo que encontra seu nicho ecológico em outra forma de vida (hospedeiro) (LEVINE, 1968), incluindo os vírus e vários outros organismos procariontes e eucariontes, como bactérias, protozoários, helmintos e artrópodes.

As doenças resultantes da interação entre um parasito e um novo hospedeiro, pode levar a um declínio na população hospedeira ou até mesmo a sua extinção (CLEAVELAND & DYE, 1995; DEEM et al., 2001; CLEAVELAND et al., 2002). Entende-se, que aproximadamente 70% das parasitoses emergentes em humanos são originárias dos animais selvagens, o que se torna cada vez mais preocupante devido ao aumento da circulação de animais domésticos em ambientes silvestres e vice-versa (MESSENGER et al., 2014).

Os parasitos possuem diferentes formas para alcançar um novo hospedeiro, algumas espécies são transmitidas através do contato direto, predação ou cópula, outras são excretadas por descargas nasais/orais ou dejetos fecais, contaminando o ambiente. E algumas dependem ainda de artrópodes hematófagos para atuarem como vetores.

Algumas espécies possuem competências próprias para sua manutenção e transmissão, dependendo de vários fatores relacionados ao curso da infecção. Podem ser considerados como reservatórios aqueles indivíduos onde o parasito vive e multiplica-se e do qual é capaz de atingir outros hospedeiros, e amplificadores aqueles que, além de manterem a infecção, favorecem a transmissão, por apresentarem elevadas parasitemias por determinado período. Hospedeiros reservatórios e amplificadores podem ter suas capacidades epidemiológicas alteradas de acordo com o estado de saúde individual, infecções secundárias e/ou estresse e condições ambientais desfavoráveis (BOTERO et al., 2013).

Considerando essas particularidades, a ocorrência de determinada parasitose em uma espécie particular de hospedeiro silvestre, bem como a atuação de diferentes indivíduos na transmissão pode variar em localidades distintas ou ainda num mesmo local, porém em diferentes épocas do ano.

Frequentemente encontramos animais com coinfeções, ou seja, expostos a mais de um parasita concomitantemente, sendo que essas inter-relações podem ocorrer por diferentes cepas de uma mesma espécie de parasita, diferentes espécies de um mesmo gênero ou, ainda, por parasitas de grupos taxonômicos distintos, podendo, inclusive, ocorrer um sinergismo entre eles, favorecendo ambos os parasitas (JOHNSON et al., 2015).

Daí a importância do estudo da ecologia dos parasitas, como uma medida auxiliar na prevenção e controle das doenças zoonóticas emergentes causadas por esses organismos, tendo em vista os casos de infecção múltipla de hospedeiros e vetores envolvidos em uma complexa rede de associações (JOHNSON et al., 2015).

1.6 Carrapatos

Atualmente, existem mais de 950 espécies de carrapatos no mundo, sendo que somente no Brasil temos o registro de aproximadamente 80 delas, distribuídas nas famílias Argasidae e Ixodidae (ONOFRIO, 2021). A família Ixodidae tem representantes distribuídos nos gêneros *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*, sendo *Amblyomma* o que apresenta maior diversidade de espécies na Região Neotropical e o de maior preocupação sanitária, por possuir espécies que são vetores de agentes patogênicos, como a bactéria *Rickettsia rickettsii* causadora da Febre Maculosa Brasileira (SANGIONI et al, 2005).

Os carrapatos são hematófagos e durante sua alimentação são capazes de transmitir patógenos de diferentes grupos, como fungos, bactérias, vírus e protozoários. São considerados como o grupo mais importante dentre os vetores de patógenos para animais e o segundo maior transmissor de agentes causadores de doenças para o homem, superados apenas pelos mosquitos. Os agentes transmitidos por carrapatos vão desde bactérias, como algumas das espécies de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Borrelia* e *Mycoplasma*, aos protozoários dos gêneros *Babesia* e *Rangelia*.

1.7 Agentes patogênicos

No Brasil diferentes estudos visando a detecção de patógenos transmitidos por carrapatos em animais de vida livre, bem como em seus ectoparasitas já foram realizados (LABRUNA et al., 2004a; MERINO et al., 2008; CRIADO-FORNELIO et al., 2009; WIDMER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; SOARES et al., 2015, 2017a,b; WITTER et al., 2016; WOLF et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; DE SOUSA et al., 2017; MONGRUEL et al., 2017; LOPES et al., 2018; COLLE et al., 2019; PERLES et al., 2019, 2022, 2023; MUNÓZ-LEAL et al., 2019; CALCHI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; SANTOS et al., 2020; MUÑOZ-LEAL et al., 2021; ANDRÉ et al., 2022; SANTANA et al., 2022; ARAÚJO et al., 2023).

1.7.1 Ordem Piroplasmida

Composta por protozoários do filo Apicomplexa, possui vários gêneros de parasitas como *Babesia*, *Theileria*, e *Cytauxzoon*. São transmitidos por carrapatos e parasitam principalmente os mamíferos, podendo em menor proporção infectar também as aves. Possui diversas espécies, algumas delas consideradas de importância médica, veterinária ou econômica (LACK et al., 2012).

Os representantes do gênero *Babesia* são protozoários intraeritrocitários transmitidos para uma variedade de hospedeiros através da picada de carrapatos (IRWIN, 2009). Atualmente, os protozoários desse gênero se encontram divididos em dois grandes grupos filogenéticos: *Babesia sensu stricto* (s.s.) e *Babesia microti* (GRAY et al., 2010; YABSLEY e SHOCK., 2013), sendo que ambos os grupos contêm agentes causadores de babesioses de importância médica e veterinária.

Nos cães a doença conhecida como babesiose canina, é predominantemente causada por *B. vogeli* e transmitida pelo carrapato *R. sanguineus*. Em relação aos animais de produção, os bovinos são os mais atingidos e a enfermidade é causada pelas espécies *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, transmitidos aos animais pelo carrapato *R. microplus* (GUGLIELMONE, 1995; BAHIA et al., 2020). A babesiose bovina é uma das doenças bovinas que mais causa prejuízos econômicos aos criadores (WOLF et al., 2016; BARBOSA et al., 2020).

Em humanos é uma doença febril aguda, e que em casos mais graves pode até mesmo ser fatal (ALMOSNY, 2002). Pode ser causada por diferentes espécies como *Babesia microti*, *Babesia divergens*, dentre outras (TABOADA; LOBETTI, 2006). No Brasil, há somente um relato com diagnóstico direto de babesiose humana, porém sem confirmação molecular (ALECRIM et al., 1983).

Os relatos de *Babesia* spp. em raposa do campo (*Pseudalopex vetulus*) (MARTINS et al., 2006), graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) (RUAS et al., 2003) e em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (SERRA-FREIRE et al., 1993), publicados para o Brasil, foram baseados em exame parasitológico e esfregaço sanguíneo, não tendo sido confirmados por técnicas moleculares.

KRAWCZAK et al. (2023) descreveram uma nova espécie para o gênero *Babesia*, denominada como *Babesia goianienses*, que foi encontrada infectando capivaras e carrapatos associados a esse hospedeiro, na cidade de Goiânia (GO), região Centro-Oeste do Brasil.

1.7.2 Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae é composta por pequenas bactérias parasitas de células eucarióticas e que se replicam dentro de vacúolos derivados da célula hospedeira (KERSTERS et al., 2006). Os carrapatos ixodídeos são os principais vetores deste grupo, e é durante sua alimentação no hospedeiro vertebrado que ele transmite esses agentes através da saliva (FUTSE et al., 2003).

Esta família apresenta cinco gêneros, organizados com base em evidências moleculares: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Neorickettsia*, e *Wolbachia*, os três primeiros abrangem agentes transmitidos por carrapatos, de importância veterinária e em saúde pública, e são os agentes causadores de Anaplasmosse e Erliquiose, doenças reconhecidas mundialmente (DUMLER et al., 2001; RAR e GOLOVLJOVA, 2011).

O gênero *Anaplasma* é representado por microorganismos intracelulares obrigatórios, cujas diferentes linhagens podem expressar tropismo por células sanguíneas específicas, infectando predominantemente granulócitos, especialmente os neutrófilos (SILAGHI et al., 2017). Além da transmissão por carrapatos, durante sua alimentação, também pode ser transmitido de “forma

mecânica” por moscas hematófagas e mosquitos, cujo ciclo no ambiente envolve uma complexa interação entre o vetor invertebrado e o hospedeiro vertebrado.

Os carnívoros selvagens e domésticos são considerados importantes hospedeiros para *Anaplasma* spp., principalmente em áreas antropizadas, onde há o contato direto entre esses animais. Algumas espécies podem infectar o homem, como no caso de *Anaplasma phagocytophilum* (PERLES et al, 2022).

Os sintomas clínicos causados pela infecção por *Anaplasma* incluem febre, dor de cabeça, petéquias, mialgia, artralgia, coceira, tosse, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, leucopenia, trombocitopenia e elevação de enzimas hepáticas.

As espécies *Anaplasma centrale* e *Anaplasma marginale* encontradas em bovinos (BARROS et al., 2005; BARRÉ; UILENBERG, 2010), *A. platys* em cães (DANTAS; TORRES, 2008) e *A. phagocytophilum* em cães, humanos, gatos e cavalos (WALKER; DUMLER, 1997; SKOTARCZAK, 2003; GREENE, 2006), são consideradas de grande importância veterinária.

Recentemente foi reportado um caso não usual de anaplasmose em humano na região amazônica, em áreas florestadas na Guiana Francesa, causada por ‘*Candidatus Anaplasma sparouinense*’, uma suposta nova espécie para este gênero. Geneticamente, apresentou maior identidade com *Anaplasma* spp. encontradas infectando animais silvestres no Brasil, e com outra espécie registrada em carrapatos *Amblyomma coelebs* coletados de quatis da região amazônica brasileira (DURON et al, 2022).

Diversas espécies de carrapatos e hospedeiros vertebrados estão envolvidos no ciclo de vida das diferentes espécies do gênero *Anaplasma*, alguns inclusive servindo como reservatórios deste agente, uma vez que desenvolvem infecções persistentes e atuam como fonte de infecção para os vetores artrópodes (KIESER et al., 1990; KOCAN et al., 1992; CASTRO et al., 2001; VILLAR et al., 2016; BATTILANI et al., 2017).

Os estudos moleculares realizados nos últimos anos no Brasil, têm apresentado uma diversidade de possíveis novas espécies dentro do gênero *Anaplasma*, infectando animais silvestres e domésticos no país.

Em um estudo realizado em uma região pantaneira de Corumbá (MS), foram encontrados animais silvestres, domésticos e três espécies de carrapato positivos para *Anaplasma* sp. que apresentou maior identidade com *A.*

phagocytophilum e *A. bovis*. A detecção molecular de *A. phagocytophilum* em cães domésticos, associada a um genótipo de *Ehrlichia* sp. encontrado em canídeos selvagens e domésticos, marsupiais, roedores silvestres, carrapatos e pulgas, evidencia a presença de diferentes agentes da família Anaplasmataceae circulando nos animais silvestres, domésticos e nos ectoparasitos dessa região (DE SOUZA et al., 2017).

Perles et al. (2022) detectaram agentes da família Anaplasmataceae em amostras de sangue de quatis capturados em duas áreas urbanas com vegetação de Cerrado no município de Corumbá (MS). O referido trabalho mostrou a detecção de um genótipo de *Anaplasma* sp. proximamente relacionado a '*Candidatus Anaplasma brasiliensis*', previamente detectada em tamanduás no estado de São Paulo (CALCHI et al., 2020).

As espécies do gênero *Ehrlichia* são bactérias gram-negativas intracelular obrigatórias pertencentes a família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). São partículas muito pequenas e semelhantes a riquetsias, encontradas em leucócitos do sangue circulante, sendo transmitidas por carrapatos da família Ixodidae. Essas bactérias podem causar duas doenças distintas, a Ehrliquiose monocítica e a Ehrliquiose granulocítica, podendo afetar humanos e cães (SKOTARCZAK, 2003).

Os sinais clínicos da Ehrliquiose monocítica humana consistem em febre, dores musculares, dor de cabeça, falta de apetite, vermelhidão da pele, náuseas, vômitos, diarreia, faringite, tosse, diarreia, dor abdominal e confusão mental. Segundos estudos apresentados pela Fiocruz, estima-se que somente um terço dos infectados fiquem doentes, com a diminuição da imunidade a pessoa fica suscetível a infecções oportunistas, como este caso.

Já a Ehrliquiose granulocítica apresenta sintomas semelhantes ao de um quadro gripal, com febre, calafrios, náuseas e vômitos, aumento dos gânglios e dor de cabeça. A doença é de grau moderado a grave se não for tratada. Exames laboratoriais podem levar o médico a confundir a doença com algum tumor.

No Brasil, estudos têm incriminado *Ehrlichia canis* como a principal espécie deste gênero, presente no país (OLIVEIRA et al., 2020). É a causadora da erliquiose monocítica canina (EMC) em cães domésticos que se infectam através da picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (SANCHES et al., 2016;

MORAES-FILHO et al., 2015). Devido à alta exposição dos cães aos carrapatos, a ocorrência desta doença acabou se tornando muito comum (VIEIRA et al., 2011).

Outras espécies de *Ehrlichia* também já foram registradas no país, *Ehrlichia ewingii* e *Ehrlichia chaffeensis* (MACHADO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), *Ehrlichia minasensis* em bovinos (AGUIAR et al., 2014; CABEZAS-CRUZ et al., 2016), e alguns haplótipos em animais silvestres (WIDMER et al., 2011; VIEIRA et al., 2016; SOARES et al., 2017b; BRAGA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019).

Três espécies de *Ehrlichia* são reconhecidas como causadoras de doenças em humanos: *E. chaffeensis*, erliquiose monocítica humana (HME), *E. ewingii* erliquiose granulocítica humana (HGE) (OLANO e WALKER., 2002), e ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ incriminada como patogênica em humanos na Europa e Ásia (PORTILLO et al., 2018). No Brasil, há relatos de pessoas positivas em sorodiagnóstico (CALIC et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2010; BEZERRA et al., 2017), porém não há evidências moleculares para suportar esses registros.

1.7.3 Gênero *Hepatozoon*

Este gênero compreende mais de 300 espécies de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa (ALMOSNY, 2002) e acometem espécies domésticas e silvestres. No Brasil, a principal espécie encontrada é *Hepatozoon canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, sendo de baixa patogenicidade nos cães domésticos. Outras espécies de carrapatos associadas à provável transmissão de *Hepatozoon*, tais como *Amblyomma ovale*, *A. aureolatum* e *A. sculptum* (RUBINI et al., 2005).

São protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa caracterizados por um ciclo de vida heteroxeno, no qual os hospedeiros vertebrados (intermediários) se infectam principalmente através da ingestão de artrópodes hematófagos (como carrapatos e mosquitos) que albergam oocistos maduros que se rompem no trato digestivo do animal liberando os esporozoítos (ALMOSNY, 2002; DANTAS-TORRES, 2008). Outras vias de transmissão, como a predação de vertebrados

infectados com cistos em seus tecidos, também são descritas e parecem ser uma rota importante de infecção, principalmente para hospedeiros carnívoros (JOHNSON et al., 2007; 2009).

A hepatozoonose é uma doença que acomete tanto animais domésticos (PALUDO et al., 2005), quanto silvestres, como felídeos neotropicais (METZGER et al., 2008) e répteis (VILCINS et al., 2009). As manifestações clínicas variam de assintomático, no caso dos animais silvestres (RUBINI et al., 2006) até casos de anorexia, diarreia, alterações pulmonares, hipertermia, anemia e apatia ou prostração (MUNDIM et al., 2008).

A hepatozoonose canina é a principal doença relacionada a esse gênero no Brasil, e é causada por *Hepatozoon canis*. Estudos sugerem uma maior prevalência da infecção por espécies de *Hepatozoon* em cães de áreas rurais (O'DWYER, 2011; DEMONER et al., 2013), onde os vetores associados são *Amblyomma ovale* (FORLANO et al., 2005) e *R. microplus* (MIRANDA et al., 2011), do que em áreas urbanas, onde o carrapato *R. sanguineus* atua como vetor (SPOLIDORIO et al., 2009).

No Brasil, existem muitos estudos relatando a ocorrência de espécies de *Hepatozoon* em carnívoros, marsupiais, roedores, répteis e anfíbios, (ANDRE et al., 2010; PERLES et al., 2019; SANTOS et al., 2020; MAIA et al., 2014; DEMONER et al., 2016). Estudos moleculares em roedores e marsupiais encontraram haplótipos que se posicionam em um grande clado composto por haplótipos associados a roedores, marsupiais e répteis. O que seria um indício do seu papel como hospedeiros paratênicos, e seu envolvimento na transmissão através da predação (WOLF et al., 2016; COLLE et al., 2019; DEMONER et al., 2019; SILVA et al., 2017; DEMONER et al., 2016).

1.7.4 Gênero *Rickettsia*

As riquetsias são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pertencentes a família Rickettsiaceae (OLANO, 2005). Agente causador das doenças que acometem o homem e são conhecidas como febre maculosa, tifo endêmico e tifo epidêmico (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; GREENE, 2006). Para serem mantidas na natureza, necessitam de um vetor artrópode, estabelecendo

uma relação de tropismo entre vetores, hospedeiros e reservatórios (CARDOSO et al., 2006).

A classificação atual das riquetsias é baseada numa abordagem multigênica, tendo sido dividida em cinco dos grupos: 1) grupo do tifo (GT), composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*; 2) grupo da febre maculosa (GFM), representado por mais de vinte espécies; 3) grupo de transição, onde estão *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; 4) grupo Canadensis, representado pela espécie *R. canadensis*, e 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* (WEINERT et al., 2009).

Atualmente existem mais de 20 espécies do gênero *Rickettsia* incriminadas como causadoras de doenças no homem, sendo a *R. rickettsii* a mais patogênica, principalmente no Brasil. Agente causador da Febre Maculosa, sua distribuição está restrita às Américas, com registros no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (LABRUNA et al., 2011). Alguns animais silvestres são reservatórios ou hospedeiros amplificadores dessa bactéria, como o caso de roedores silvestres nos Estados Unidos, e das capivaras e gambás no Brasil (LABRUNA, 2009).

No Brasil, diferentes espécies de carrapatos já foram encontradas infectadas com *R. rickettsii*, porém até o momento somente *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum* são comprovadamente vetores da bactéria no país (PINTER; LABRUNA, 2006).

Outra espécie que vem ganhando destaque no país é *Rickettsia parkeri*, mais especificamente a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Isso devido ao aumento e constância no número de casos diagnosticados, e a alta taxa de infecção dos carrapatos na natureza. Ocorre em áreas de Mata Atlântica próximas a costa brasileira e tem como vetores carrapatos das espécies *A. ovale* e *A. aureolatum*. (SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA, 2009; BARBIERI et al., 2014; FACCINI-MARTINÉZ et al., 2020; KMETIUK et al., 2022).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo investigar a presença de agentes com potencial zoonótico, transmitidos por carrapatos, em animais silvestres atropelados em rodovias paulistas.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Área de coleta

As amostras de ectoparasitos e tecidos investigados neste projeto foram provenientes de animais silvestres atropelados nas rodovias SP-225, SP-327 e SP-270 no estado de São Paulo (Figura 3).

O Corredor Raposo Tavares possui um total de 834 quilômetros entre Bauru e Presidente Epitácio, sendo 444 no eixo principal e 390 de estradas vicinais. Fazem parte deste corredor as rodovias SP-225 João Baptista Cabral Rennó, de Bauru a Santa Cruz do Rio Pardo; SP-327 Orlando Quagliato, de Santa Cruz do Rio Pardo a Ourinhos e SP-270 Raposo Tavares, de Ourinhos a Presidente Epitácio. As rodovias que compõem este corredor atravessam 27 municípios do centro-oeste paulista, e dão acesso ao início da SP-280 Rodovia Castelo Branco, que faz conexão com o Mato Grosso do Sul e com o norte do Paraná.

3.2 Obtenção, armazenamento e conservação das amostras

Foram utilizadas amostras de 36 animais (Tabela 1), atropelados entre 2021 e 2022, obtidas por meio de doação pela empresa Via Fauna (Anexo 1). As alíquotas aqui utilizadas são provenientes das amostras originais de sangue, fígado, pulmão e baço, a depender do estado de conservação e viabilidade dos órgãos. Destes 36 animais, 11 apresentaram ectoparasitos.

Quando encontrados nas rodovias, os animais atropelados eram recolhidos e caso estivessem mortos, eram mantidos congelados para posterior retirada de amostras biológicas, incluindo ectoparasitos e tecidos de diferentes órgãos internos. As amostras colhidas eram acondicionadas em microtubos e mantidas a 20°C negativos até o momento do processamento.

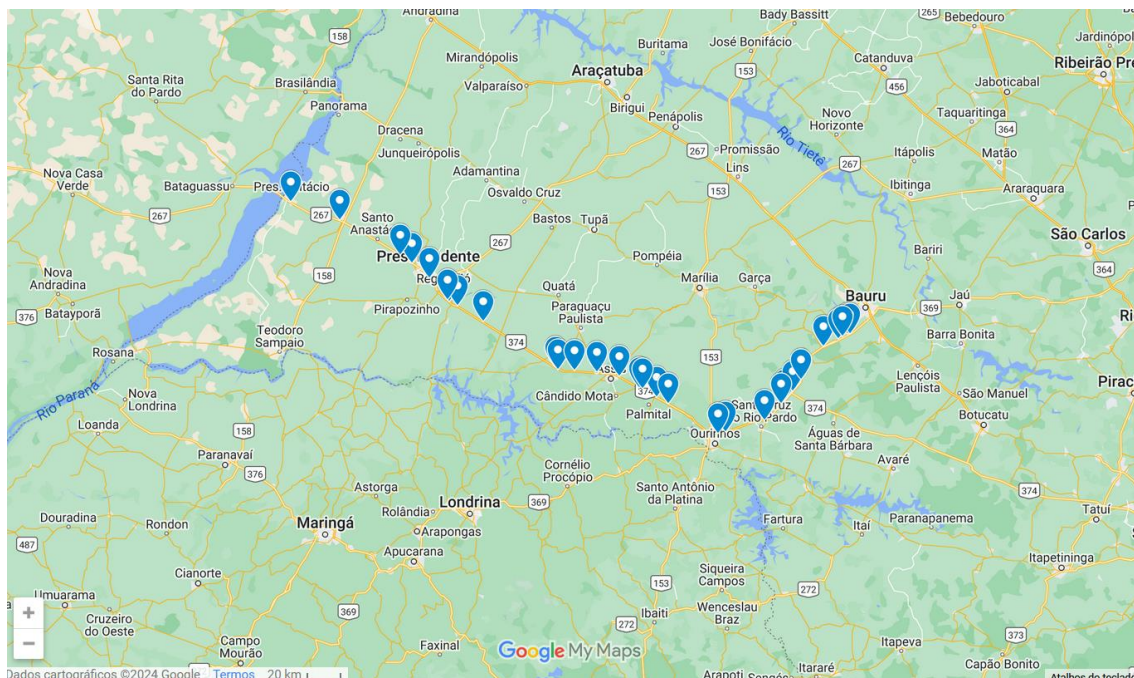


Figura 3. Mapa com a localização dos pontos de coleta nas rodovias onde os animais atropelados foram encontrados. Fonte: Aplicativo MyMaps (2023)

3.3 Identificação dos ectoparasitos

A identificação dos ectoparasitos foi feita com base no exame da morfologia e utilização de chaves de identificação específicas para cada um dos grupos colhidos (KIM & WEISSER, 1974; BARROS-BATTESTI et al., 2006; MARTINS et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2019).

Após identificação, os ectoparasitas foram depositados na coleção Acarológica do Instituto Butantan.

3.4 Extração de DNA

De cada alíquota de tecido foram retirados fragmentos menores (200 mg) para extração de DNA e o restante do material foi congelado a 20°C negativos para ser utilizado posteriormente, caso necessário. A extração de DNA dos tecidos foi realizada utilizando kit comercial (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme as instruções do fabricante.

Tabela1. Espécies de animais silvestres encontrados atropelados nas rodovias.

Espécie	Nome popular	N	Tecido
Mamíferos			
<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Bugio-ruivo	1	pulmão, fígado, baço
<i>Coendou</i> sp.	Ouriço-cacheiro	2	pulmão, fígado, baço
<i>Dasypus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	3	pulmão, fígado, baço
<i>Didelphis aurita</i>	Gambá-de-orelha-preta	1	-----
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu-peba	2	pulmão, fígado, baço
<i>Galictis cuja</i>	Furão-pequeno	1	pulmão, baço
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	4	pulmão, fígado, baço
<i>Lutrinae</i>	Lontra	1	pulmão, fígado, baço
<i>Mazama</i> sp.	Cervídeo	2	-----
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	4	pulmão, fígado, baço
<i>Nasua nasua</i>	Quati	1	pulmão, fígado, baço
<i>Procyon cancrivorus</i>	Guaxinim	1	pulmão, baço
<i>Sapajus</i> sp.	Macaco-prego	1	pulmão, fígado, baço
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	1	pulmão, fígado, baço
Aves			
<i>Caracara plancus</i>	Carcará	1	-----
<i>Cariama cristata</i>	Seriema	6	pulmão, fígado, baço
<i>Cyanocorax cristatellus</i>	Gralha-do-campo	1	pulmão, fígado, baço
<i>Patagioenas picazuro</i>	Pomba-asa-branca	2	pulmão, baço, sangue
<i>Penelope</i> sp.	Jacu	1	pulmão, baço
Répteis			
<i>Tupinambis</i> sp.	Teiú	1	pulmão, fígado

N - Número de animais

3.5 Quantificação do DNA extraído

Para avaliação da quantidade de DNA obtido na extração, foi realizada a quantificação nas amostras extraídas em Espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-Vis, ThermoScientific, USA).

3.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Todas as amostras de tecido foram testadas quanto a presença de DNA dos agentes descritos a seguir, utilizando os protocolos 3.6.1 a 3.6.4. As informações dos primers utilizados no presente trabalho estão descritos no quadro 1.

3.6.1 *Rickettsia*

Para pesquisa de riquésias, cada amostra de DNA foi testada por PCR utilizando-se um par de primers (CS-78 e CS-323), que amplificam um fragmento de 401 pb do gene *gltA*, presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004a,b). Para cada reação foram utilizados controles negativos (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) e positivo (*Rickettsia parkeri* cepa NOD). Foram utilizados dois outros primers para amplificação de fragmentos dos genes *gltA* (CS4-239 e CS4-1069) que amplificam fragmentos de 834, para melhor caracterização molecular de uma amostra (LABRUNA et al, 2004a,b).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 2,5 µl de DNA extraído acrescido de 22,5 µl de Mix [12,6 µl de água de Milli-Q; 4 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA); 2,5 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA); 1,25 µl de cada primer; 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA); e 0,15 µl de Taq polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA)], para um volume total de 25 µl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf® California, USA), para o gene *gltA* eram: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos à 72°C, e 7 minutos à 72°C. Para o gene *ompA*: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 45 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C. Para o

gene htrA: 1 ciclo à 94°C 38 por 3 minutos, seguido por 25 ciclos de 45 segundos à 94°C, 30 segundos à 56°C e 90 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C.

3.6.2 Família Anaplasmataceae

Na PCR para *Anaplasma* spp., cada amostra de DNA foi testada com um par de primers EHR16SD senso e EHR16SR anti-senso para o gene 16S que amplifica um fragmento de 345 pb do gene 16S rRNA de praticamente todos os membros da Família Anaplasmataceae (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000).

A PCR para o gene 16S foi realizado em solução total de 25 µL contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum 39 TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. As condições térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles positivo (DNA de cães positivos para *Ehrlichia canis*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

3.6.3 Hepatozoon

Para detecção de DNA de *Hepatozoon* spp., foram utilizados os primers HEP2 144-169 e HEP2 743-718, que amplifica um fragmento de cerca de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp., conforme protocolo preconizado por Almeida et al. (2012). Para todas as reações foram utilizados controles positivos (DNA de *H. canis* obtido de cão doméstico do Rio Grande do Norte) e negativo (água Milli-Q).

Todas as reações de PCR foram realizadas em solução total de 25 µL contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. Os ciclos de temperaturas da PCR foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C.

3.6.4 Ordem Piroplasmida

Para detecção de hemoparasitas da ordem Piroplasmida foram utilizados os primers BAB2 143-167 e BAB2 694-667, correspondentes a regiões conservadas do gene 18S rRNA dos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cythauxzoon*, que amplifica um fragmento de cerca de 551 pb, de acordo com protocolo utilizado por Almeida et al. (2012). Controles positivo (DNA de sangue de equino positivo para *Theileria equi*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

A PCR foi realizada em solução total de 25 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), e 0,2 mM de cada primer. As condições 40 dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial utilizada por 5 minutos à 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 58°C, e 30 segundos à 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final à 72°C.

Quadro 1 - Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de patógenos.

Gene / Primers	Especificidade	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Fragmento Amplificado	Referência
<i>gltA</i>	<i>Rickettsia</i>			
CS 78		F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 pb	Labruna et al., 2004 ^a
CS 323		R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
CS 239		F- GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834 pb	Labruna et al., 2004b
CS 1069		R- CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
16S	Família Anaplasmataceae			
EHR 16SD		F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345 pb	Inokuma et al., 2000
EHR 16SR		R- TAGCACTCATCGTTTACAG		
18S	<i>Hepatozoon</i>			
HEP2 144-169		F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574 pb	Almeida et al., 2012
HEP2 743-718		R- ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG		
18S	Ordem Piroplasmida			
BAB2 143-167		F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551 pb	Almeida et al., 2012
BAB2 694-667		R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		

3.7 Leitura e análise dos produtos da PCR

Todos os produtos da PCR (5 μ L DNA amplificado acrescido de 2 μ L de corante Gel Loading Buffer (Invitrogen® Carlsbad, CA) foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (1,5 mg de Agarose Ultra-Pure Invitrogen® Carlsbad, CA; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (0,1 μ L/mL) e tampão de corrida TBE 0,5X pH 8,0 à 110V/50mA. O gel foi visualizado luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager®). As amostras que revelavam bandas de DNA na altura do controle positivo, confirmando a amplificação de nucleotídeos, eram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

3.8 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), que consiste em Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em microtubos de 500 μ L, previamente identificados, foram adicionados 4 μ L de ExoSAP e 10 μ L da amostra amplificada na PCR, em seguida as amostras foram colocadas no termociclador durante 30 minutos (15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C).

Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit comercial BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com especificações do fabricante, sendo 5 μ L de DNA purificado (concentração máxima de 100 ng), 1 μ L de água Milli-Q, 1 μ L de “Big Dye”, 1 μ L de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/ μ L) e 2 μ L de buffer. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) disponível no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a Sorologia (LaBMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.9 Análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, Wis.) e submetidas a análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST two sequences analysis) (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

3.10 Análises filogenéticas

As sequências obtidas para os diferentes grupos de patógenos e genes foram alinhadas com diversas sequências disponíveis no GeneBank. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997) e ajustado manualmente no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997). As análises filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). Devido ao número de taxa, a análise foi feita utilizando-se algoritmos heurísticos para a busca da árvore mais parcimoniosa. A opção padrão do PAUP foi utilizada. Os métodos de Parcimônia procuram a árvore que minimize o número de passos (substituição de nucleotídeos ou aminoácidos) para explicar os padrões observados nos dados. A fim de determinar os valores que apoiam cada braço da árvore filogenética utilizamos o método estatístico “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985). Assim, quanto maior o número de vezes que um determinado braço ocorre na estimativa, maior é a confiança da existência deste braço. A matriz de similaridade foi construída utilizando o programa Point Replacer v. 2.0 (<http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>).

4 Resultados

4.1 Ectoparasitos coletados

Dos 11 animais que apresentaram ectoparasitos, dez estavam infestados exclusivamente por carrapatos e um por carrapato e piolhos. A quase totalidade dos animais que apresentaram ectoparasitos eram mamíferos, com exceção de uma ave da espécie *Cariama cristata*, popularmente conhecida como seriema (Tabela 2).

No total, foram coletados 106 carrapatos, sendo 21 (19,8%) ninfas e 85 (80,2%) adultos [46 (54,1%) machos e 39 (45,9%) fêmeas]. Destes, 105 pertenciam ao gênero *Amblyomma*, das espécies *Amblyomma dubitatum* (12), *Amblyomma nodosum* (26), *Amblyomma ovale* (1), *Amblyomma sculptum* (65), *Amblyomma* sp. (2) e um único exemplar da espécie *Rhipicephalus microplus*. Em um hospedeiro do gênero *Mazama*, foram coletados três exemplares de piolho da espécie *Solenopotes binipilosus* (Tabela 2).

Nas quatro amostras de *Myrmecophaga tridactyla* e uma de *Tamandua tetradactyla* foram identificados exemplares de *A. nodosum*, espécie de carrapato comumente encontrada nesse grupo de mamíferos. Na única amostra coletada em *Procyon cancrivorus* foi encontrado apenas uma fêmea de *A. ovale*, espécie que utiliza os carnívoros como hospedeiros habituais.

A espécie de carrapato *A. sculptum* foi encontrada parasitando três capivaras (*Hidrochoerus hydrochaeris*) e um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Em duas capivaras foi registrada infestação mista por carrapatos das espécies *A. dubitatum* e *A. sculptum*, e em um tamanduá-bandeira infestação por *A. nodosum* e *A. sculptum*, sendo que a última espécie foi encontrada em um número muito superior ao da primeira.

Um exemplar de *Mazama* sp. estava parasitado por carrapatos da espécie *R. microplus* e por piolhos *S. binipilosus*. E na única ave (*C. cristata*) infestada com ectoparasitos, foram encontradas duas ninfas de carrapato do gênero *Amblyomma* (Tabela 2).

Os carrapatos foram depositados na Coleção Acarológica do Instituto Butantan (IBSP), sob números de tombo de IBSP 19.319 a 19.329.

Tabela 2: Espécies de carrapatos e piolhos coletados de animais silvestres atropelados nas rodovias SP-225, SP-327 e SP-270 no estado de São Paulo.

Amostra	Hospedeiros	Ectoparasitos	Espécie	Nº de exemplares
1	<i>Dasypus novemcinctus</i>			
3	<i>Tupinambis</i> sp.			
4	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	carrapato	<i>A. dubitatum</i> , <i>A. sculptum</i>	3F, 4M 1F
5	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	carrapato	<i>A. dubitatum</i> , <i>A. sculptum</i>	5F 2F, 2M
6	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>			
7	<i>Penelope</i> sp.			
8	<i>Cyanocorax cristatellus</i>			
9	<i>Alouatta guariba clamitans</i>			
11	<i>Dasypus novemcinctus</i>			
13	<i>Cariama cristata</i>			
16	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	carrapato	<i>A. sculptum</i>	2F, 2M, 19N
17	<i>Cariama cristata</i>			
19	<i>Patagioenas picazuro</i> - indivíduo 1			
20	<i>Patagioenas picazuro</i> - indivíduo 2			
22	<i>Cariama cristata</i>			
23	<i>Cariama cristata</i>			
26	<i>Didelphis aurita</i>			
29	<i>Tamandua tetradactyla</i>	carrapato	<i>A. nodosum</i>	2F, 5M
30	<i>Euphractus sexcinctus</i>			
31	<i>Mazama</i> sp.			
32	<i>Lutrinae</i>			
33	<i>Euphractus sexcinctus</i>			
34	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	carrapato	<i>A. nodosum</i>	1F, 4M
35	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	carrapato	<i>A. nodosum</i>	5M
36	<i>Cariama cristata</i>			
37	<i>Sapajus</i> sp.			
38	<i>Galictis cuja</i>			
39	<i>Cariama cristata</i>	carrapato	<i>Amblyomma</i> sp.	2N
40	<i>Dasypus novemcinctus</i>			
42	<i>Nasua nasua</i>			
43	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	carrapato	<i>A. nodosum</i> <i>A. sculptum</i>	5M 22F, 14M
48	<i>Mazama</i> sp.	carrapato e piolho	<i>R. microplus</i> <i>S. binipilosus</i> <i>A. nodosum</i>	1M 3 exemplares 4M
49	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	carrapato	<i>A. nodosum</i>	4M
53	<i>Coendou</i> sp.			
54	<i>Coendou</i> sp.			
56	<i>Procyon cancrivorus</i>	carrapato	<i>A. ovale</i>	1M
57	<i>Caracara plancus</i>			

F: fêmea; M: macho; N: ninfa

4.2 Amostras de sangue e tecidos

Um total de 101 amostras biológicas, provenientes dos 36 animais investigados, foram testadas para a presença de hemoparasitas dos gêneros *Rickettsia* e *Hepatozoon*, da família Anaplasmataceae e da ordem Piroplasmida. Sendo 36 (35,7%) amostras de pulmão, 35 (34,7%) de fígado, 28 (27,7%) de baço e duas (2,0%) de sangue. Das amostras testadas, 30 (83,3%) de pulmão, 27 (96,4%) de baço, 26 (74,3%) de fígado e uma (50,0%) de sangue foram positivas para um ou mais dos agentes investigados (Tabela 3). Somente três animais, sendo eles *Didelphis aurita*, *Coendou* sp. e *Caracara plancus*, foram negativos para os todos os agentes testados.

Amostras de pulmão, baço, fígado ou sangue de 33 dos 36 animais testados foram positivas para a presença de DNA de hemoparasitas da ordem Piroplasmida. Cinco de pulmão e/ou baço foram positivas para o gênero *Hepatozoon* e somente uma de pulmão para a família Anaplasmataceae. Todas as amostras de sangue e tecidos foram negativas quanto à presença de DNA de *Rickettsia* (Tabela 3).

Mamíferos, aves e répteis de diferentes espécies tiveram amostras de sangue e tecido positivas na PCR para protozoários da ordem Piroplasmida. Dentre os mamíferos, estão *D. novemcinctus* (pulmão, fígado e baço), *E. sexcinctus* (pulmão e fígado), *H. hidrochaeris* (pulmão, fígado e baço), *T. tetradactyla* (pulmão, fígado e baço), *M. tridactyla* (pulmão, fígado e baço), *A. guariba clamitans* (pulmão, fígado e baço), *Sapajus* sp. (pulmão, fígado e baço), *P. cancrivorus* (pulmão e baço), *G. cuja* (pulmão e baço), *N. nasua* (pulmão, fígado e baço), *Mazama* sp. (pulmão e fígado), *Coendou* sp. (pulmão, fígado e baço), e um representante da subfamília Lutrinae (pulmão, fígado e baço). Quanto as aves, *Penelope* sp. (pulmão e baço), *C. cristatellus* (pulmão, fígado e baço), *C. cristata* (pulmão, fígado e baço) e *P. picazuro* (pulmão, fígado, baço e sangue). Com relação aos répteis, amostras de tecido de um único lagarto do gênero *Tupinambis* foram testadas, com pulmão e fígado positivos para Piroplasmida.

Cinco animais apresentaram amostras de tecido positivas pela PCR para protozoários do gênero *Hepatozoon*, sendo três *M. tridactyla* (pulmão e baço), um *Galictis cuja* (pulmão) e um representante da subfamília Lutrinae (pulmão e

baço). Tecidos (pulmão, fígado e baço) destes mesmos animais também apresentaram positividade para protozoários da ordem Piroplasmida. A infecção por bactérias da família Anaplasmataceae, foi detectada somente em uma amostra de pulmão de *Mazama* sp., que também foi positiva para representantes da ordem Piroplasmida, bem como o fígado.

4.3 Sequenciamento

As amostras consideradas positivas após a realização da PCR foram quantificadas, purificadas e enviadas para sequenciamento. Porém, as sequências geradas não ficaram boas, impossibilitando a sua análise. As amostras serão testadas novamente e submetidas a um novo sequenciamento.

Tabela 3: Resultados da detecção molecular pela PCR de protozoários da ordem Piroplasmida e gênero *Hepatozoon*, e bactérias da família Anaplasmataceae e gênero *Rickettsia* em sangue e tecidos coletados de animais silvestres atropelados nas rodovias SP-225, SP-327 e SP-270 no estado de São Paulo.

Amostra	Hospedeiros	PIROPLASMIDA	HEPATOZOON	ANAPLASMATACEAE	RICKETTSIA
1	<i>Dasybus novemcinctus</i>	pulmão, fígado, baço			
3	<i>Tupinambis</i> sp.	pulmão, fígado			
4	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	pulmão, fígado, baço			
5	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	pulmão, baço			
6	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	pulmão, fígado, baço			
7	<i>Penelope</i> sp.	pulmão, baço			
8	<i>Cyanocorax cristatellus</i>	pulmão, fígado, baço			
9	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	pulmão, fígado, baço			
11	<i>Dasybus novemcinctus</i>	pulmão, fígado, baço			
13	<i>Cariama cristata</i>	pulmão			
16	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	pulmão, fígado, baço			
17	<i>Cariama cristata</i>	pulmão, fígado, baço			
19	<i>Patagioenas picazuro</i> - indivíduo 1	pulmão, baço, sangue			
20	<i>Patagioenas picazuro</i> - indivíduo 2	BP			
22	<i>Cariama cristata</i>	pulmão, fígado, baço			
23	<i>Cariama cristata</i>	pulmão, fígado, baço			
26	<i>Didelphis aurita</i>	-----			
29	<i>Tamandua tetradactyla</i>	pulmão, fígado, baço			
30	<i>Euphractus sexcinctus</i>	pulmão, fígado, baço			
31	<i>Mazama</i> sp.	-----			
32	<i>Lutrinae</i>	pulmão, fígado, baço	pulmão, baço		
33	<i>Euphractus sexcinctus</i>	pulmão, fígado			
34	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	fígado			
35	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	fígado, baço	baço		
36	<i>Cariama cristata</i>	pulmão, fígado, baço			
37	<i>Sapajus</i> sp.	pulmão, fígado, baço			
38	<i>Galictis cuja</i>	pulmão, baço	pulmão		
39	<i>Cariama cristata</i>	pulmão, fígado, baço			
40	<i>Dasybus novemcinctus</i>	fígado			
42	<i>Nasua nasua</i>	pulmão, fígado, baço			
43	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	pulmão, fígado, baço	pulmão		
48	<i>Mazama</i> sp.	pulmão, fígado		pulmão	
49	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	pulmão, fígado, baço	baço		
53	<i>Coendou</i> sp.	pulmão, fígado, baço			
54	<i>Coendou</i> sp.	-----			
56	<i>Procyon cancrivorus</i>	pulmão, baço			
57	<i>Caracara plancus</i>	-----			

5 Discussão

Não foi possível quantificar e classificar o grau de infestação nos hospedeiros, pois não houve uma padronização da metodologia de coleta e as amostras foram colhidas por conveniência. O fato de, na maioria das vezes, não ser possível saber há quanto tempo o animal está morto, também impossibilita avaliar o grau de infestação, pois uma vez que se inicia o processo de resfriamento do corpo, os carrapatos começam a se desprender em busca de um novo hospedeiro.

Animais atropelados acabam ficando muitas horas expostos às intempéries climáticas e aos atropelamentos repetitivos, o que acaba diminuindo ou até mesmo impossibilitando a coleta dos ectoparasitos. Soares et al. (2015), em um estudo realizado nos estados do Mato Grosso e Pará, registrou o encontro de um maior número de carrapatos em animais recém mortos do que naqueles encontrados atropelados nas rodovias. Almeida (2013), também relatou um baixo parasitismo por carrapatos em cachorros-do-mato (*C. thous*) atropelados em rodovia no estado do Espírito Santo.

Dessa maneira, o número de animais infestados, bem como a quantidade de carrapatos colhidos e identificados neste estudo, pode ser menor e não refletir os dados reais de infestação desses hospedeiros quando ainda vivos.

O encontro de *A. ovale* em carnívoros como *Procyon cancrivorus* não é um registro incomum, uma vez que a espécie que tem neste grupo de mamíferos, principalmente nos canídeos, os seus hospedeiros preferenciais (LABRUNA et al., 2005). O mesmo para as amostras de carrapatos colhidas em quatro *M. tridactyla* e um *T. tetradactyla*, onde foram identificados exemplares de *A. nodosum*, espécie esta cujos adultos parasitam quase que exclusivamente este grupo de mamíferos (BECHARA et al., 2002; MARTINS et al., 2004; QUADROS et al., 2009; GARCIA et al., 2013; MARTINS et al., 2014; WITER et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017; LUZ et al., 2020; MARTINS et al., 2020).

Dois dos três espécimes de capivara (*H. hidrochaeris*) examinados, apresentaram infestações mistas por *A. dubitatum* e *A. sculptum* e o terceiro somente por *A. sculptum*. Apesar da capivara ser considerada o principal hospedeiro de *A. dubitatum* (NAVA et al., 2010), no sudeste do Brasil é relativamente comum a infestação desses roedores com ambas as espécies de

carrapato (HEIJDEN et al., 2005; PEREZ et al., 2008; SZABÓ et al., 2013). Também nesta região, as altas infestações ambientais por *A. sculptum* estão associadas a presença de cavalos e capivaras que são hospedeiros dos estágios adultos do carrapato (LABRUNA et al., 2001; PACHECO et al., 2007).

Um dos quatro espécimes de *M. tridactyla* examinados apresentou infestação mista por adultos de *A. nodosum* e *A. sculptum*, sendo que o número de exemplares desta última espécie de carrapato foi ultrapassado em sete vezes o da primeira.

Um exemplar de *Mazama* sp. estava parasitado por *R. microplus*, espécie de carrapato que parasita bovinos. Este tipo de parasitismo talvez possa ser explicado se levarmos em conta o ponto da rodovia onde o cervídeo foi atropelado, que é ladeado por campos de pastagem, indicando o provável deslocamento do cervídeo em áreas de criação de animais domésticos.

Silveira et al. (2011) registraram a ocorrência de carrapatos das espécies *R. microplus*, *D. nitens* e *A. sculptum* parasitando *M. gouazoubira* de vida livre em Minas Gerais. Inclusive com três cervídeos apresentando co-infestação pelas três espécies de carrapato e outros dois por duas delas.

No mesmo exemplar de *Mazama* sp. que estava parasitado por *R. microplus*, foram encontrados piolhos da espécie *S. binipilosus*. Os cervídeos são seus hospedeiros habituais e sua distribuição está restrita ao continente americano, ocorrendo nas américas do Norte, Central e do Sul (DURDEN & MUSSER, 1994). Na América do Sul há registros para a Argentina em *M. gouazoubira* e *M. americana* (CASTRO & CICCHINO, 1998), Chile em *Pudu puda* e *Hippocamelus bisulcus* (GONZÁLEZ-ACUÑA et al., 2004, 2009) e Peru em *Odocoileus virginianus peruvianus* (MURGA-MORENO et al., 2023).

No Brasil há um único relato de exemplares de *S. binipilosus* parasitando veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) em Minas Gerais (SILVEIRA, 2012), porém estes dados são parte dos resultados de uma tese de doutorado que, até o momento, não foi publicado. O parasitismo em *Mazama* sp. é o segundo registro para o país e o primeiro para o estado de São Paulo.

Todas as amostras de tecido e sangue dos animais silvestres testados foram negativas pela PCR para bactérias do gênero *Rickettsia*. A detecção de *Rickettsia* em tecidos de vertebrados é um acontecimento pouco frequente, pois uma vez infectados apresentam ricketsemia por alguns dias ou semanas, e

depois disso a bactéria não é mais encontrada no hospedeiro (BURGDORFER et al., 1989).

Neste estudo, amostras de pulmão, fígado e baço de quati (*Nasua nasua*) apresentaram positividade na PCR para hemoparasitas da ordem Piroplasmida. Soares et al. (2017a) testaram amostras de pulmão e fígado de um quati em Mato Grosso, porém ambas foram negativas para os representantes desta ordem. Perles et al. (2023) testaram amostras de sangue de 163 quatis coletados em duas áreas urbanas de cerrado no município de Campo Grande (MS), porém nenhuma delas foi positiva para Piroplasmida.

Amostras de tecidos das três capivaras (*H. hydrochaeris*) foram positivos para Piroplasmida na PCR. Criado-Fornelio et al. (2009) relataram infecção de capivaras do Rio Grande do Sul por hemoparasitos cujas sequências foram 90% similares a *T. equi*.

Tecidos (pulmão e fígado) de *Mazama* sp. foram testados e mostraram positividade para Piroplasmida neste estudo. Este mesmo animal foi positivo para Anaplasmataceae e estava infestado com carrapatos de bovinos e porcos. Soares et al. (2017a) coletou amostras de tecido de veado-mateiro (*M. americana*) do estado do Pará, cujas sequências geradas apresentaram 100% de identidade com *Theileria cervi*. No Brasil, o primeiro trabalho a detectar *T. cervi* em cervídeos foi realizado em Minas Gerais, sendo que nesse mesmo estudo, foram também encontrados animais positivos para outros piroplasmas incluindo *Theileria* sp., *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (SILVEIRA et al., 2011).

Dois primatas, um bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) e um macaco-prego (*Sapajus* sp.), tiveram as amostras de pulmão, fígado e baço positivas para Piroplasmida. Soares et al. (2017a) testaram amostras de pulmão e fígado de três primatas do gênero *Sapajus*, sendo dois do estado do Mato Grosso e um do Pará, porém todas foram negativas para os hemoparasitos desta ordem.

Hematozoários da ordem Piroplasmida foram detectados em pulmão e baço de um guaxinim (*P. cancrivorus*) investigado neste estudo. Duas espécies geneticamente distintas de piroplasmas foram registradas pela primeira vez no Brasil em guaxinins de vida livre no Rio Grande do Sul (DE LORENZO, 2021). Porém estes dados são parte dos resultados de uma tese de doutorado que, aparentemente, ainda não foram publicados.

Com relação as aves, seis indivíduos das espécies *C. cristata*, dois *P. picazuro*, um *Penelope* sp. e um *C. cristatellus* apresentaram amostras de tecido e sangue positivas na PCR para Priplasmida. Soares et al. (2017a) testaram amostras de tecidos de seis espécies de aves do município de Confresa (MT), incluindo dois exemplares de *Penelope superciliaris*, mas nenhuma das amostras foi positiva.

O único réptil, um lagarto do gênero *Tupinambis*, cujo pulmão e fígado foram investigados apresentou positividade em ambos os tecidos. Amostras de tecido colhidas de dois *Kinosternon scorpioides* e três *Caiman crocodilos*, do município de Confresa (MT), foram testadas para Piroplasmida e *Hepatozoon*, porém ambas as espécies de répteis foram positivas somente para o segundo agente (SOARES et al., 2017a).

Amostras de tecido de cinco animais foram positivas pela PCR para detecção de protozoários do gênero *Hepatozoon*, sendo três *M. tridactyla* (pulmão e baço), um *Galictis cuja* (pulmão) e um representante da subfamília Lutrinae (pulmão e baço).

A infecção por bactérias da família Anaplasmataceae, foi detectada somente em uma amostra de pulmão de *Mazama* sp., que também estava infestada por carrapatos de bovinos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Silveira et al. (2012) enfatizam a importância dos cervídeos como reservatórios naturais para os representantes desta família e relatam a ocorrência de diferentes espécies infectando *Mazama gouazoubira* e *Blastocerus dichotomus* de vida livre e cativo em Minas Gerais.

No Brasil, evidências moleculares da presença de *A. marginale* e *E. chaffeensis* já foram descritas em cervídeos (Machado et al., 2006; Picoloto et al., 2010). Soares et al. (2017b) obteve amostras de pulmão e baço positivas para membros da família Anaplasmataceae, colhidas de dois veados-mateiros (*M. americana*) provenientes dos estados do Mato Grosso e Pará. As sequências geradas para o primeiro cervídeo apresentaram similaridade de 97% com *Anaplasma phagocytophilum* e para o segundo 100% com *Anaplasma bovis*.

Diversos registros de cervídeos infectados por diferentes espécies de Anaplasmataceae já foram publicados, porém as consequências destas infecções para a saúde desses animais ainda não estão claras (Duarte, 2007). Algumas espécies desta família, como é o caso de *Ehrlichia chaffeensis*, podem

ser responsáveis por infecções sintomáticas em humanos e subclínicas, porém persistentes, em cervídeos e canídeos (Ewing et al., 1995; Dawson et al., 1996).

Alguns hemoparasitas desta família podem causar sérios problemas para ruminantes domésticos, que devido a ação antrópica estão cada vez mais em contato com animais selvagens, incluindo os cervídeos, considerados reservatórios naturais para diferentes espécies de Anaplasmataceae (Duarte & González, 2010).

Os carrapatos e piolhos colhidos dos animais silvestres não foram investigados para a presença de hemoparasitas.

6 Considerações finais

Nas amostras de ectoparasitos analisadas foi possível observar a baixa especificidade de *A. sculptum* em relação aos seus hospedeiros, pois nos três animais que apresentaram infestações mistas, esta espécie foi encontrada com outras que são específicas dos indivíduos parasitados.

Também foi observado o parasitismo de carrapatos de animais domésticos em silvestres, indicando o possível deslocamento desses últimos em áreas onde circulam animais de criação e conseqüentemente sua proximidade com o homem. Aumentando assim o risco de transmissão de agentes entre os animais silvestres, domésticos e o homem.

Os resultados deste estudo reforçam a relevância da investigação sobre os artrópodes parasitas de animais silvestres, podendo inclusive servir como um alerta para a presença de ectoparasitas vetores de agentes patogênicos, como é o caso do *Amblyomma sculptum*, encontrado parasitando capivaras e tamanduá.

Outro fato que chamou a atenção foi que 33 dos 36 animais investigados tiveram amostras de tecido positivas para agentes da Ordem Piroplasmida. Havendo representantes de diferentes grupos de vertebrados, como mamíferos, aves e répteis.

A detecção e identificação de agentes infecciosos em animais silvestres não é apenas crucial para a proteção das espécies, mas também para fornecer importantes informações sobre as relações epidemiológicas de uma doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; ZILIANI, T.F.; ZHANG, X. et al. **A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis.** Ticks and Tick Borne Diseases, v.5, p.537-544, 2014.

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

ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. ***Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae).** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 3, p. 203- 206, 2012.

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. **Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil.** Journal of Medical Entomology, v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.

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

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.; VARGAS, G.H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A.R.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.; MACHADO, R.Z. **Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores.** Veterinary Parasitology, v. 173, n. 1–2, p. 134–138. 2010.

ANDRÉ, M.R.; CALCHI, A.C.; PERLES, L.; GONÇALVES, L.R.; UCCELLA, L.; LEMES, J.R.B.; NANTES, W.A.G.; SANTOS, F.M.; PORFÍRIO, G.E.O.; BARROS-BATTESTI D.M., et al. **Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil.** Ticks and Tick-Borne Diseases, v. 13, 102022, 2022.

ARAÚJO, I.M., DE AZEVEDO BAÊTA, B., MAGALHÃES-MATOS, P.C. et al. **Molecular survey of potentially pathogenic microorganisms in ticks collected from coatis (*Nasua nasua*) in Iguaçu National Park, Atlantic Forest biome, southern Brazil.** Parasitol Res (2023).

ASSIS, J. C.; FURLAN, S. A. III Congresso Brasileiro de Ecologia de Estradas: Road Ecology Brazil 2014. GEOUSP – Espaço e Tempo (Online), São Paulo, v. 18, n. 2, p. 461-463, 2014.

BAHIA, M.; SILVA, J.S.; GONTIJO, I.S.; CORDEIRO, M.D.; SANTOS, P.N.D.; SILVA, C.B.D.; NICOLINO, R.R.; MOTA, D.A.; SILVA, J.B.D.; FONSECA, A.H. **Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.29, n.1, 2020.

BARBIERI, A.R.M.; MORAES- FILHO, J.; NIERI-BASTOS. F.A.; SOUZA JR., J.C.; SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. **Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 5, p. 848–853, 2014.

BARBOSA, C.O.S.; GARCIA, J.R.; FAVA, N.M.N.; PEREIRA, D.A.; DA CUNHA, M.J.R.; NACHUM-BIALA, Y.; CURY, M.C.; BANETH, G. **Babesiosis caused by *Babesia vogeli* in dogs from Uberlândia State of Minas Gerais, Brazil.** Parasitology Research, v.119, n.3, 1173-1176, 2020.

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

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. **Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick.** Revue Scientifique et Technique, v. 29, n. 1, p. 149-160, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo/BR: Vox /ICTTD-3/ Butantan, p. 223, 2006.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. **Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-aridregion of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; ALMEIDA, W.V.F.O.; BECHARA, J.N.; PEREIRA, R.J.G.; GARCIA, J.E. et al. **Ticks associated with armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) of Emas National Park, State of Goiás, Brazil.** Ann N Y Acad Sci; 969(1): 290-293, 2022.

BEZERRA, M.C.F.; MELO, A.L.T.; TAQUES, I.I.G.G.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; SLHESARENKO, R.D. **Seropositivity for *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in the human population of Mato Grosso, Central-Western Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.50, n.3, p.399-403, 2017.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. **Agentes Rickettsiais de doenças animais; as Riquétsias.** In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). Microbiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-275.

BIRKENHEUER, A. D.; HORNEY, B.; BAILEY, M.; SCOTT, M.; SHERBERT, B.; CATTO, V.; MARR, H. S.; CAMACHO, A-T.; BALLMAN, A. E. ***Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes.** Veterinary Parasitology, v. 172, n. 3/4, p. 179-182, 2010.

BOTERO, A., THOMPSON, C. K., PEACOCK, C. S., CLODE, P. L., NICHOLLS, P. K., WAYNE, A. F., . . . & THOMPSON, R. C. **Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*)**. International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife, 29(2), 77-89, 2013.

BRAGA, M.D.S.C.O.; PEREIRA, J.G.; FERNANDES, S.J.; MARQUES, I.C.L.; JESUS, R.P.; FERREIRA, G.S.; XAVIER, D.R.; BENEVENUTE, J.L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. **Molecular detection of Anaplasmataceae agents in *Dasyprocta azarae* in northeastern Brazil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 12, n.1, p. 99-105, 2018.

Burgdorfer W. Hayes SF. Corwin D. **Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodid ticks**. Reviews of Infectious Diseases, v. 11, Suppl 6, S1442–S1450, 1989.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGAR, T.H.E.; VANCOVÁ, M.; BRONISZEWSKA, M.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; ALBERDI, P., DE LA FUENTE, J. ***Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus***. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.66, n.3, p1426-1430, 2016.

CALCHI A.C., VULTÃO J.G., ALVES M.H., YOGUI D.R., DESBIEZ A.L.J., SANTI M.D., DE SOUZA SANTANA M., DA SILVA T.M.V., WERTHER K., TEIXEIRA M.M.G.I. ***Ehrlichia* sp. and *Anaplasma* sp. in *Xenarthra* mammals from Brazil, with evidence of novel ‘Candidatus *Anaplasma* sp.’** Sci. Rep. 10:12615, 2020.

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

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C. VILAS BOAS; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A.M. **Caracterização de *Rickettsia* sp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CASTRO, D.C.; CICCHINO, C.A. **Anoplura**. In: Biodiversidad de artrópodos Argentinos, Una perspectiva biotaxonómica, J. Morrone, S. Coscarón (eds.). Ediciones Sur: La Plata, Argentina, pp. 125–143, 1998.

CEBALLOS, G.; EHRlich, PR; BARNOSKY, AD; GARCÍA, A.; PRINGLE, RM; PALMER, TM. **Perdas aceleradas de espécies modernas induzidas pelo homem: Entrando na sexta extinção em massa**. Science Advances, v. 1, n. 5, e1400253.2015.

CLEAVELAND, S.; DYE, C. **Maintenance of a microparasite infecting several host species: rabies in the Serengeti.** Parasitology, v. 111, p. S33-S47, 1995.

CLEAVELAND, S.; HESS, G. R.; DOBSON, A. P.; LAURENSEN, M. K.; McCALLUM, H. I.; ROBERTS, M. G.; WOODROFFE, R. **The role of pathogens in biological conservation.** In: HUDSON, P. J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B. T.; HEESTERBEEK, H.; DOBSON, A. P. (Ed.). The ecology of wildlife diseases. New York: Oxford University Press, p.139-150, 2002.

COLLE, A.C.; MENDONÇA, R.F.B.; MAIA, M.O.; FREITAS, L.D.C.; WITTER, R.; MARCILI, A.; et al. **Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.28, p. 592-604, 2019.

CONAMA: **RESOLUÇÃO CONAMA nº 1, de 23 de janeiro de 1986.** Disponível em:https://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=745

CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. **Wild animals and public health.** In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa University Press, p.493-499, 2001.

COSTA, A. S. **Efeito de escalas temporais na definição de medidas de mitigação de impactos de rodovias.** 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ecologia Aplicada, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

COUTINHO, L. M. **O bioma do cerrado.** In: Klein, A. L (org.). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; CASADO, N.; GIMENEZ, C.; RUAS, J.; WENDT, L.; ROSA-FARIAS, N.; PINHEIRO, M.; REY-VALEIRON, C.; BARBACARRETERO, J. C. **Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain.** Acta Parasitologica, v. 54, n. 3, p. 187-193, 2009.

CUTLER, S.J.; FOOKS, A.R.; POEL, W.H.M. van der. **Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world.** Emerging Infectious Diseases, v.16, p.1-7, 2010.

CYMBALUK, F. **Animais na pista: estudo aponta 475 milhões de bichos atropelados por ano nas estradas do Brasil; acidentes matam 300 pessoas. Estudo aponta 475 milhões de bichos atropelados por ano nas estradas do Brasil; acidentes matam 300 pessoas.** 2018. Disponível em: <https://www.uol/noticias/especiais/animais-na-pista.htm>. Acesso em: 08 set. 2020.

DANTAS-TORRES, F. **Canine vector-borne diseases in Brazil.** Parasites & Vectors, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T.F.; MUÑOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys.** Ticks Tick Borne Diseases, v. 10, n. 6. 101252, 2019.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A; HYATT, A.D. **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife.** Acta Trop. Feb 23;78(2):103-16, 2001.

DA SILVA, M.R.L.; FORNAZARI, F.; DEMONER, L.C.; TEIXEIRA, C.R.; LANGONI, H.; O'DWYER, L.H. ***Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil.** Ticks Tick Borne Dis. Oct;8(6):878-881, 2017.

DAWSON, J. E.; BIGGIE, K. L.; WARNER, C. K.; COOKSON, K.; JENKINS, S.; LEVINE, J. F.; OLSON, J.G. **Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, and etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia.** Am. J. Vet. Res. 57, 1175-1179, 1996.

DE LORENZO, C. **Piroplasmídeos em canídeos e procionídeos.** Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 109p. 2021.

DE SOUSA, K.C.M.; CALCHI, A.C.; HERRERA, H.M.; DUMLER, J.S.; BARROS-BATTESTI, D.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ M.R. **Anaplasmataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil.** Epidemiol Infect. Dec;145(16):3424-3437, 2017.

DEEM, S. L.; KARESH, W. B. & WEISMAN, W. **Putting theory into practice: wildlife health in conservation.** Conservation Biology 13: 1246-1256, 2001.

DEMONER, L.C.; RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; METZGER, B.; ANTUNES, J.M.A.P.; MARTINS, T.F.; MATHIAS, M.I.C.; O'DWYER, L.H. **Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 4, p. 542–546, 2013.

DEMONER, L.C.; MAGRO, N.M.; DA SILVA, M.R.L.; DE PAULA, A. J.M.A.; CALABUIG, C.I.P.; O'DWYER, L.H. ***Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v.7, p859-864, 2016.

DOMINGUES, M. S.; BERMANN, C.; SIDNEIDE, M. **A produção de soja no Brasil e sua relação com o desmatamento na Amazônia.** Revista Presença Geográfica, v. 1, n. 1, 2014.

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

DUARTE, J.M.B; GONZÁLEZ, S. (eds). **Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland: IUCN. 393 pp, 2010.

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

DURDEN, L.A. & MUSSER, G.G. **The sucking lice (Insecta: Anoplura) of the world: A taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions**. Bulletin of the American Museum of Natural History, 218, 1-90, 1994.

DURON, O.; KOUAL, R.; MUSSET, L.; BUYSSE, M.; LAMBERT, Y.; JAULHAC, B.; BLANCHET, D.; ALSIBAI, K.D.; LAZREK, Y.; EPELBOIN, L., et al. **Novel Chronic Anaplasmosis in Splenectomized Patient, Amazon Rainforest**. Emerging Infectious Diseases, v. 28, p. 1673-1676, 2022.

EWING, S. A.; DAWSON, J. E. KOCAN, A. A.; BARKER, R. W.; WARNER, C. K.; PANCIERA, R. J.; FOX, J. C.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F. **Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) among White-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae)**. J. Med. Entomol. 32, 368-374, 1995.

FACCINI-MARTÍNEZ, A.A.; MUÑOZ-LEAL, S.; KRAWCZAK, F.S.; ACOSTA, I.C.L.; MARTINS, T.F.; SERPA, M.C.A.; BARBIERI, A.R.M.; TOVAR, J.R.; CERUTTI JR, C.; LABRUNA, M.B. **Epidemiological aspects of *Rickettsia parkeri* in the Atlantic forest biome of Espírito Santo state, Brazil**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 11, 1013, 2020.

FERREIRA, I. J. M. *et al.* **Landscape pattern changes over 25 years across a hotspot zone in southern Brazil**. Southern Forests, v. 81, n. 2, p. 175-184, 2019.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap**. Evolution, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FICETOLA GF, MAZEL F, THUILLER W. **Global determinants of zoogeographical boundaries**. Nat Ecol Evol. Mar 6;1(4):89, 2017.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. **Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil**. Veterinary

Parasitology, v.25, n.134, p.1-7, 2005.

FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. **Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction.** Journal of Clinical Microbiology, v.41, p.3829-3834, 2003.

GARCIA, M.V.; SILVA, D.C.; ALMEIDA, R.F.C.; CUNHA, R.C.; MATIAS, J.; BARROS, J.C., et al. **Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 22, n. 1, p. 124-128, 2013.

GIBBS, H.K. et al. **Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s.** PNAS, v, 107 p. 16732-16737, 2010.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. 1387 p.

FOWLER, M.E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals.** Ames: Iowa University Press, p. 493-499, 2010.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; D. C. DEL CASTRO, L. MORENO, AND E. MEY. 2004. **First records of lice (Insecta: Phthiraptera) from wild southern pudu, *Pudu puda* (Mammalia: Artiodactyla: Cervidae).** European Journal of Wildlife Research 50: 216-217, 2004.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; SAUCEDO, G. C.; CORTI, P.; CASANUEVA, M. E., & CICCHINO, A. **First records of the louse *Solenopotes binipilosus* (Insecta: Phthiraptera) and the mite *Psoroptes ovis* (Arachnida: Acari) from wild southern huemul (*Hippocamelus bisulcus*).** Journal of wildlife diseases, 45(4), 1235-1238, 2009.

GRAY, J.; ZINTL, A.; HILDEBRANDT, A.; HUNFELD, K.P.; WEISS, L. **Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity.** Ticks and Tick-borne Diseases, v.1, n.1, p.3-10, 2010.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, p. 1387, 2006.

GUGLIELMONE, A.A. **Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America.** Veterinary Parasitology, v.57, p. 109-119, 1995.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J.M.; PEIXOTO, M.P.; DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; SANTOS, H.A.; BALDANI, C.D. **Molecular detection, characterization of *Anaplasma* spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state.** Acta Tropica, v.191, p. 239-242, 2019.

HEIJDEN, K. M.; SZABÓ, M. P. J.; EGAMI, M. I.; CAMPOS PEREIRA, M.; MATUSHIMA, E. R. **Histopathology of tick-bite lesions in naturally infested**

capybaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*) in Brazil. Experimental and Applied Acarology, v. 37, p. 245-255, 2005.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. **Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa island, Japan.** Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

IRWIN, P. J. **Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control.** Parasite & Vectors, v. 2, p. S4, 2009. (Supplement 1).

JOHNSON, P. T.; DE ROODE, J. C.; FENTON, A. **Why infectious disease research needs community ecology.** Science 349(6252), 1259504, 2015.

JOHNSON, E.M.; PANCIERA, R.J.; ALLEN, K.E.; SHEETS, M.E.; BEAL, J.D.; EWING, S.A.; et al. **Alternate Pathway of Infection with *Hepatozoon americanum* and the Epidemiologic Importance of Predation.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.23, p. 1315-1318, 2009.

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

KERSTERS, K.; D E VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. **Introduction to the Proteobacteria.** In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY. 2006.

KIM, K. C.; & WEISSER, C. F. **Taxonomy of *Solenopotes* Enderlein, 1904, with redescription of *Linognathus panamensis* Ewing (Linognathidae: Anoplura).** Parasitology, v. 69, n. 2, p. 107-135, 1974.

KMETIUUK, L.B.; PAULA, W.V.F.; PÁDUA, G.T.; DELAI, R.R.; FREITAS, A.R.; FARINHAS, J.H.; DE PAULA, L.G.F.; GIUFFRIDA, R.; PIMPÃO, C.T.; ÁLVARES SANTARÉM, V.; DOS SANTOS, A.P.; FIGUEIREDO FB, KRAWCZAK FDS, BIONDO AW. **Epidemiology of *Rickettsia* sp. in Atlantic rainforest areas of island and seashore mainland, southern Brazil.** Transbound Emerging Diseases, vol. 69, n. 6 p. 3597-3605, 2022.

KRAWCZAK, F.D.S; CALCHI, A.C.; NEVES, L.C.; DIAS, S.A.; DA SILVA, B.B.F.; PAULA, W.V.F.; DE PAULA, L.G.F.; TAVARES, M.A.; PÁDUA, G.T.; DE LIMA, N.J.; CARDOSO, E.R.N.; GRAZIANI, D.; DANTAS-TORRES, F.; ANDRÉ, M.R. **Phylogenetic Inferences Based on Distinct Molecular Markers Confirm a Novel *Babesia* Species (*Babesia goianiaensis* nov. sp.) in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and Associated Ticks.** Microorganisms, v. 11, n. 8, 2022, 2023.

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

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. L.; CAMARGO, M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. ***Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil.** *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 1073-1081, 2004a.

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

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

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. **A preliminar investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil.** *Veterinary Parasitology*, v. 143, p. 189-195, 2007.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. ***Rickettsiosis* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal.** *Revista MVZ Córdoba*, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LACK, J.B.; REICHARD, M.V.; van den BUSSCHE, R.A. **Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences.** *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 4, p. 353–363. 2012.

LAINSON, R.; PAPERNA, I.; NAIFF, R. D. **Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 103-113, 2003.

LAURANCE, W. F. et al. **A global strategy for road building.** *Nature*, USA, v. 513, p. 229, 2014.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man.** Burgess Publishing Company, 1968.

LOPES, F. C.; AZEVEDO, S. S.; DANTAS, L. A. B.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, A. S. **Occurrence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in captive *Boa constrictor* snakes in the semi-arid of Rio Grande do Norte state, northeastern Brazil.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 62, n. 5, p. 1285-1287, 2010.

LOPES, M.G.; MUÑOZ-LEAL, S.; DE LIMA, J.T.R.; FOURNIER, G.F.D.S.R.; ACOSTA, I.D.C.L.; MARTINS, T.F.; RAMIREZ, D.G.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. **Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil.** International Journal of Parasitology and Parasites Wildlife, v. 7, n. 3, p. 380-385, 2018.

LUZ, H.R.; MARTINS, T.F.; MUÑOZ-LEAL, S.; COSTA, F.B.; GIANIZELLA, S.L.; FACCINI, J.L.; LABRUNA, M.B. **Ticks from the Brazilian Amazon: Species, Distribution and Host-Relations.** 34 p. In: Mikkola H. J. (Edt.). Ecosystem and Biodiversity of Amazonia. London: IntechOpen, 256p, 2020.

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

MAIA, J. P.; ALVARES, F.; BORATYNSKI, Z.; BRITO, J.C.; LEITE, J.V.; HARRIS, D. J. **Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups.** Journal of Wildlife Diseases, v.50, p.837-848, 2014.

MARTINS, J.R.; MEDRI, I.M.; OLIVEIRA, C.M.; GUGLIELMONE, A.A. **Occurrence of ticks on giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and collared anteater (*Tamandua tetradactyla*) in the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil.** Ciência Rural, v. 34, n. 1, p. 293-295, 2004.

MARTINS, T. F.; CUROTTO, S. M. R.; SILVA, F. M. P.; TEIXEIRA, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S. ***Ancylostoma* sp. e *Babesia* sp. associadas ao parasitismo por *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI IXODIDAE) em Raposinha-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) (CARNIVORA CANIDAE) no Centro de Recuperações de Animais Silvestres da FMVZ - Unesp - Botucatu - SP.** (Resumo) In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLOGICOS, p. 15, 2006.

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

MARTINS, T.F.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A, et al. **New tick records from the state of Rondônia,**

western Amazon, Brazil. Experimental and Applied Acarology, v. 62, n. 1, p. 121-128, 2014.

MARTINS, T.F.; REIS, J.L.; VIANA, E.B.; LUZ, H.R.; ODA, F.H.; DANTAS, S.P.; et al. **Ticks (Acari: Ixodidae) on captive and free-ranging wild animals in Tocantins State, a Cerrado-Amazon transition region of northern Brazil.** International Journal of Acarology; 46: 254-257, 2020.

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

MERINO, S., VÁSQUEZ, R.A., MARTÍNEZ, J., CELIS-DIEZ, J.L., MARTÍNEZ-DE-LA PUENTE, J., MARÍN-VIAL, P., et al. **A Sarcocystid misidentified as *Hepatozoon didelphydis*: molecular data from a parasitic infection in the blood of the Southern mouse opossum (*Thylamys elegans*) from Chile,** Journal of Eukaryotic Microbiology, n.55, p. 536-540, 2008.

MESSENGER, A. M.; BARNES, A. N.; & GRAY, G. C. **Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals.** Plos One, v. 9, n. 2, 2014.

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

Ministério do Meio Ambiente. 2023. Plataforma oficial de dados do Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Disponível em: <https://cnuc.mma.gov.br/> [Acesso Jun 16, 2023].

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

MITTERMEIER, R.A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS T.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOREUX, J. & FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** CEMEX, Mexico City, 392 pp, 2005.

MOÇO, T. C.; O'DWYER, L. H.; VILELA, F. C. **Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 1169-1176, 2002.

MONGRUEL, A.C.; BENEVENUTE, J.L.; ANDRÉ, M.R.; CARRASCO, A.O.; MACHADO, R.Z.; SEKI, M.C. **Molecular characterization of Anaplasma sp. in free**

living gray brockets (*Mazama gouazoubira*). Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v.17, p.165–171, 2017.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. **Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis.** PLoS One, v.10, 2015.

MUNDIM, A. V.; MORAIS, I. A.; TAVARES, M.; CURY, M. C.; MUNDIM, M. J. S. **Clinical and hematological sings associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 153, p. 3-8, 2008.

MUÑOZ-LEAL, S.; LOPES, M.G.; MARCILI, A.; MARTINS, T.F.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M.B. **Anaplasmataceae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile.** Acta Tropica, v.192, p.91–103, 2019.

MUÑOZ-LEAL, S.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; TEIXEIRA, B.M.; MARTINS, M.M.; SERPA, M.C.A.; OLIVEIRA, G.M.B.; JORGE, F.R.; PACHECO, R.C.; COSTA, F.B.; LUZ, H.R.; LABRUNA, M.B. **Relapsing Fever Group *Borreliae* in Human-Biting Soft Ticks, Brazil.** Emerging Infectious Diseases, v.27, n.1, p.322-324, 2021.

MURGA-MORENO, C.A.; RUIZ-PÉREZ, D.; ROJAS-MONCADA, J.; ORTIZ, P.; SÁNCHEZ, L.; TORREL-PAJARES, S.; LARESCHI, M. **Parásitos en un venado de cola blanca silvestre en Cajamarca, Perú.** Revista peruana de biología 30(4): e26580 001 – 010, 2023.

NASCIMENTO, K.K.G.; VERÍSSIMO, S.M.M.; RAIÁ, V.A.; GUIMARÃES, R.C.S.; SEADE, G.C.C.; AZEVEDO, A.C.P.; et al. **Tick fauna of wild animals received and attended at the Santarém Zoological Park, western Pará State, Brazil.** Ciencia Rural, v. 47, 20170159, 2017.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZÁLES, E. M.; MANGOLD, A. J.; et al. **Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae).** Experimental and Applied Acarology, v. 51, 2010.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, JR, H.B.; DEERFIELD II, D.W. **GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation,** EMBNEW.NEWS, v. 4, n. 14, 1997.

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

OLANO, J. P. ***Rickettsial* infections.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1063, p. 187-196, 2005.

OLANO, J.P.; WALKER, D.H. **Human ehrlichioses**. Medical Clinics of North America, v.86, n.2, p.375-392, 2002.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, R.M.; CONCEIÇÃO, L.G.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C. **First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil**. Clinical microbiology, v.15, n.2, p.55-56, 2009.

OLIVEIRA, G.M.B.; SILVA, I.W.G.; EVARISTO, A.M.V.F.; SERPA, M.C.A.; CAMPOS, A.N.S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; AGUIAR, D.M.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. **Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semiarid Caatinga biome, northeastern Brazil**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 11, n. 4, 2020.

ONOFRIO, V.C. **Carrapatos: devemos nos preocupar com eles?** In.: Camila Lorenz, Flávia Virgínio, Gabriel C. Lima (Org.). VIVER NO FUTURO AINDA TEM CLIMA PRA ISSO? Aquecimento global, seus impactos e a revolução dos artrópodes. p. 66-70, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Zoonoses. Technical Report Series 971. Reference Group on Zoonoses and Marginalized Infectious Diseases of Poverty. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>>. Acesso em: 20 de out de 2023.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAESFILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; AND LABRUNA, M. B. **Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri***. Biomedica, v. 27, p. 364-371, 2007.

PALUDO, G. R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A. K.; MACINTIRE, D.; WHITLEY, E. M.; BOUDREAUX, M. K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B. L.; DYKSTRA, C. C. **Hepatozoon sp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs**. Parasitology Research, v. 97, p. 167-170, 2005.

PANDA, A.K.; THAKUR, S.D.; KATOCH, R.C. **Rabies: control strategies for Himalayan states of the Indian subcontinent**. Journal of Communicable Diseases, v.40, p.169-175, 2008.

PEÑA, A. P.; DRUMOND, M. E. **Levantamento de vertebrados mortos por atropelamento na rodovia GO-244 – Área de influência do projeto de irrigação “Luiz Alves do Araguaia”**. Relatório. 1999.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A F.; ALMEIDA, A; CARVALHO, V.H.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S., et al. **Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa no Estado de São Paulo**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, p. 210-217, 2008.

PERLES, L.; ROQUE, A.L.R.; D'ANDREA, P.S.; LEMOS, E.R.S.; SANTOS, A.F.; MORALES, A.C. et al. **Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil**. Scientific Reports, v.9, 2019

PERLES, L.; HERRERA, H.M.; BARRETO, W.T.G.; DE MACEDO, G.C.; CALCHI, A.C.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. **Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Anaplasmataceae Agents, '*Candidatus Ehrlichia dumleri*' and *Anaplasma* sp., in Ring-Tailed Coatis (Carnivora: *Nasua nasua*) from Urban Forested Fragments at Midwestern Brazil**. Microorganisms, v. 10, n. 12, 2379, 2022.

PERLES, L.; DE MACEDO, G.C.; BARRETO, W.T.G.; FRANCISCO, G.V.; HERRERA, H.M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. **Longitudinal dynamics and health impact of *Hepatozoon procyonis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) on naturally infected ring-tailed coatis *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) from Midwestern Brazil**. Ticks and Tick - Borne Diseases, v. 13, n. 5, 101982, 2022.

PERLES, L.; BARRETO, W.T.G.; DE MACEDO, G.C.; CALCHI, A.C.; BEZERRA-SANTOS, M.; MENDOZA-ROLDAN, J.A.; OTRANTO, D.; HERRERA, H.M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. **Molecular detection of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. in coatis (*Nasua nasua*) and associated ticks from midwestern Brazil**. Parasitology Research, v. 122, p. 1151-1158, 2023.

PICOLOTO, G., R.; FERREIRA DE LIMA, L. A. O.; OLEGÁRIO, C. M. E.; CARVALHO, A. C. R.; LACERDA, W. M.; TOMÁS, P. A. L.; BORGES, A. O.; PELLEGRIN, C. R.; MADRUGA. **Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 19, p. 186–188, 2010.

PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, P.; PALOMAR, A.M.; SANTIBÁÑEZ, S.; OTEO, J.A. **'*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in Europe**. New Microbes New Infections, v.6, n.22, p.30-36, 2018.

QUADROS, R. M.; BENEDET, R.; MAZZOLLI, M.; MARQUES, S. M. T. ***Amblyomma nodosum* (Acari: Ixodidae) infesting collared anteater (*Tamandua tetradactyla*, Linnaeus, 1758) in Urupema, Santa Catarina**. BIOCÊNCIAS, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 109-110, 2009.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. ***Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review**. Infection, Genetics and Evolution, v.11, n.8, p. 1842-1861, 2011.

RUAS, J. L.; FARIAS, N. A. R.; SOARES, M. P.; BRUM, J. G. W. ***Babesia* sp. em graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) no sul Brasil**. Arquivo do Instituto e Biologia, v. 70, n. 1, p. 113-114, 2003.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. **Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil**. Parasitology Research, v. 97, p. 91-93, 2005.

SAFAR, N. V. H.; MAGNAGO, L. F. S.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Resilience of lowland Atlantic forests in a highly fragmented landscape: insights on the temporal scale of landscape restoration**. Forest Ecology and Management, Amsterdam, v. 470, 1181-83, 2020.

SANCHES, G.S.; ÉVORA, P.M.; MANGOLD, A.J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. **Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae)**. Veterinary Parasitology, v.15, n.215, p.78-87, 2

SANGIONI, L. A. et al. **Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity**. Emerging Infectious Diseases, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SANTANA, M.S.; HOPPE, E.G.L.; CARRARO, P.E.; CALCHI, A.C.; DE OLIVEIRA, L.B.; DO AMARAL, R.B.; MONGRUEL, A.C.B.; MACHADO, D.M.R.; BURGER, K.P.; BARROS-BATESTTI, D.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. **Molecular detection of vector-borne agents in wild boars (*Sus scrofa*) and associated ticks from Brazil, with evidence of putative new genotypes of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and haemoplasmas**. Transboundary and Emerging Diseases, v. 69, n. 5, e2808-e2831, 2022.

SANTOS, E.C.F.; MOURA-MARTINIANO, N.O.; VILELA, R.V.; LUCIO, C.S.; SILVA, A.F.; OLIVEIRA, S.V.; GAZETA, G.S. ***Hepatozoon* Infecting Bats in the Southeastern Brazilian Rainforest**. Journal of Wildlife Diseases, v.56, n.3, p., 693-697, 2020.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. **Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change**. Biodiversity and Conservation, London, v. 24, p. 2319-2331, 2015.

SERRA-FREIRE, N. M.; TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM, A.; GAZÊTA, G. S.; NUNES, A. L. V.; YADA, H. S.; TEIXEIRA, C. **Babesiose associada ao parasitismo por carrapatos em lobo guará**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, São Paulo. Anais ... São Paulo: CSBZ, p. 161, 1993.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J. S. **Guidelines for the direct detection of *Anaplasma* sp. in diagnosis and epidemiological studies**. Vector Borne and Zoonotic Diseases, Larchmont, v. 17, n. 1, p.12-22, 2017.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M.B. **First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil**. Emerging Infectious Diseases, v.13, p.1111-1113, 2007.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. **Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil**. Veterinary Parasitology, v. 177, p. 61-66, 2011.

SILVEIRA, J.A.G. **Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814), veado-campeiro (*Ozotocercus bezoarticus* Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus* Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2012, 131p.

SILVEIRA, J. A. G. E. M.; RABELO, L.; RIBEIRO, M. F. B. **Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens of the Family Anaplasmataceae in Brazilian Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and Marsh Deer (*Blastocercus dichotomus*, Illiger, 1815)**. Transboundary and Emerging Diseases, v. 59, p. 353-360, 2012.

SHRESTHA, K. P.; ACHARYA, K. P.; SHRESTHA, S. **One health: The interface between veterinary and human health**. International Journal of One Health. 2018; 4:8-14. Disponível em: <<https://www.onehealthjournal.org/Vol.4/2.pdf>>.

SKOTARCZAK, B. **Canine Ehrlichiosis**. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, v. 10, n. 2, p. 137-141, 2003.

SOARES, H.S.; BARBIERI, A.R.; MARTINS, T.F.; MINERVINO, A.H.; DE LIMA, J.T.; MARCILI, A.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. **Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon**. Exp. Appl. Acarol. 65, 125e140, 2015.

SOARES, H.S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A.R.M.; MINERVINO, A.H.H.; MOREIRA, T.R.; GENNARI, S.M.; et al. **Novel piroplasmid and Hepatozoon organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon**. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v.6, p115-121, 2017a.

SOARES, H.S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A.R.M.; MINERVINO, A.H.H.; MALHEIROS, A.F.; GENNARI, S.M.; et al. **Novel *Anaplasma* and *Ehrlichia* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon**. Acta Tropica, v.174, p.82-87, 2017b.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. ***Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil**. Veterinary Parasitology, v.163, n.4, p.357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. **Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.83, n. 1, p. 201-206, 2010.

SWOFFORD DL. Sinauer; Sunderland, Massachusetts: **pp.PAUP[±]: Phylogenetic analysis using parsimony (±and other methods)**, version 4; 1998.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. **Babesiosis**. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 722-736.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools**. Nucleic Acids Research, v. 25, p. 4876- 4882, 1997.

TROCMÉ, M. **Habitat fragmentation due to linear transportation infrastructure: An Overview of Mitigation Measures in Switzerland**. Swiss Transport Research Conference, Switzerland, p. 15-17, 2003.

VIEIRA, R. F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.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. **Ehrlichiosis in Brazil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 20, n.1, p.1-12, 2011.

VIEIRA, T.; VIEIRA, R.F.; KRAWCZAK, F.S.; SOARES, H.S.; GUIMARÃES, A.M.; et al. **Ehrlichia sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil**. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. v. 48, p. 1-5, 2016.

VILCINS, I. M. E.; UJVARI, B.; OLD, J. M.; DEANE, E. **Molecular and morphological description of a Hepatozoon species in reptiles and their ticks in the Northern territory, Australia**. Journal of Parasitology, v. 95, n. 2, p. 434-442, 2009.

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

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. **Evolution and diversity of Rickettsia bacteria**. BMC Biology, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

WIDMER, C.E., AZEVEDO, F.C., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. **Tick-borne bacteria in free-living jaguars (Panthera onca) in Wetland, Brazil**. Vector Borne and Zoonotic Diseases. v.11, n.5, 2011.

WITTER, R.; MARTINS, T.F.; CAMPOS, A.K.; MELO, A.L.T.; CORREA, S.H.R.; MORGADO, T.O.; et al. **Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, p. 415-423, 2016.

WOLF, R.W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L.B.; MELO, A.L.T.; BRAGA, I.A.; et al. Novel ***Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Wetland, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil**. Ticks and Tick-Borne Diseases, v.7, p. 449-456, 2016.

YABSLEY, M.J.; SHOCK, B.C. **Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs**. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v.22, n.2, p.18-31, 2012.

Anexo 1. Termo de doação das amostras biológicas.



TERMO DE DOAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Pelo presente termo, eu, **Msc. Dra. Fernanda Delborgo Abra**, sócia na empresa ViaFAUNA Consultoria Ambiental, venho confirmar a doação de tecidos e ectoparasitas coletados dos animais silvestres atropelados nas rodovias concessionadas pela CART (SP-225; SP-327; SP-270). O material entregue, fará parte do projeto de pesquisa intitulado "**Identificação de ectoparasitas de animais silvestres atropelados em rodovias brasileiras**", sob a responsabilidade da **Prof. Dra. Valeria Castilho Onofrio** – Universidade de Santo Amaro – UNISA.

São Paulo, 22 de março de 2023.

FERNANDA
DELBORGO
ABRA:329411
56879

Assinado de forma
digital por FERNANDA
DELBORGO
ABRA:32941156879
Dados: 2023.03.24
12:18:58 -03'00'

Msc. Dra. Fernanda Delborgo Abra
ViaFAUNA Estudos Ambientais LTDA