

Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814), veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus* Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares

Belo Horizonte

2012

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814), veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus* Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro/ICB/UFMG

Co-Orientadora: Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo/ICB/UFMG

Colaborações: Dr. Antônio Último de Carvalho/EV/UFMG

Dr. Elias Jorge Facury Filho/EV/UFMG

Belo Horizonte

2012

Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da.

Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814), veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus* Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares. [manuscrito] / Júlia Angélica Gonçalves da Silveira. – 2012.

131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro. Co-orientadora: Élide Mara Leite Rabelo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Cervídeo – Brasil – Teses. 2. Parasito - Teses. 3. Biologia molecular - Teses. 4. Parasitologia – Teses. I. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa. II. Rabelo, Élide Mara Leite. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.89

As instituições que contribuíram para a realização deste trabalho foram:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Corumbá/Mato Grosso do Sul;

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Belo Horizonte/Minas Gerais;

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais.

Esta tese foi desenvolvida nos Laboratórios de Protozoologia Veterinária e de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e na clínica de ruminantes do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, todos pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Aos animais, motivo pelo qual desenvolvo meu trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida em todos os sentidos.

Aos meus pais, pelo exemplo de profissionalismo ético, amor e apoio constante.

Aos meus irmãos, cunhados e Rafinha, pela força direta e indireta e por darem importância aos meus sonhos e escolhas. Lé, muito obrigada pela revisão de português!

Ao Leandro, por apoiar e valorizar meu trabalho e pelo amor e companheirismo compartilhados.

A todo o restante da minha família e aos meus sogros, que em algum momento apoiaram meu trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, a quem admiro cada dia mais, orientador de verdade e exemplo de profissionalismo ético.

À Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo, que me acolheu em seu laboratório e se tornou uma verdadeira orientadora e amiga.

Aos professores Elias Jorge Facury Filho e Antônio Último de Carvalho, que sempre apoiaram e contribuíram para o meu trabalho, e aos professores Marcos Pezzi Guimarães e Walter dos Santos Lima, que me apoiaram e ajudaram na minha formação como docente.

Aos professores José Ramiro Botelho e Ricardo Toshio Fujiwara.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, a todos seus professores e funcionários em especial ao Sr. Nery.

À Sumara, pelo esforço constante em ajudar os alunos de pós-graduação, e pela amizade construída ao longo de nossa convivência.

Aos queridos Hudson, Zuleika e Geni, pelo apoio na minha jornada de formação como docente.

Às amigas do Laboratório de Protozoologia Veterinária: Camila, Mercês, Bruna, Paula, Anna, Simone e Nayara, companheiras de trabalho e das conquistas e decepções que ele nos proporciona.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular, minha segunda casa no ICB, por toda ajuda e amizade: Diana, Sílvia, Ana Flávia, Luciana, Carina, Gabrileia, Flaviane e o agregado Sydney.

Aos amigos da Clínica de ruminantes, pela ajuda com os bezerras e carneiros.

Aos amigos do Laboratório de Doença das Aves, companheiros de GEAS (Grupo de Estudos sobre Animais Selvagens) e amantes dos animais silvestres, em especial aos professores Nelson Martins e José Sérgio Resende.

Aos professores Renato de Lima e Natália Ocarino, pela disponibilidade da sala de necropsias do Hospital Veterinário da UFMG.

Às Clínicas Veterinárias Cães e Amigos e Animal Center pela disponibilidade para a coleta de material nos cervídeos sob seus cuidados.

Ao Helton Aguiar e ao Breno Rosseti da Fazenda Engenho-d'água, pelo desenvolvimento do projeto Concervo (Centro de Conservação e Estudos de Cervídeos Brasileiros) e apoio a essa pesquisa.

À Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte e aos veterinários: Marcelo Malta, Herlandes Tinoco, Ângela Tinoco, Maria Elvira e aos funcionários, que acreditaram e contribuíram com meu trabalho.

À Renata Tomich, por intermediar minha parceria com a EMBRAPA-Pantanal.

Aos amigos que contribuíram com esta pesquisa: Michel Valim, Daniel Vilela, Cecília Barreto, Paula Senra, Alessandra Vitelli e Gregório Almeida.

Aos queridos amigos da graduação da veterinária: Luciana, Daniel, Kenia, Luana, Paula, Felipe e toda Moçada jovem linda!

Aos amigos Victor, Fernando, companheiros da Fesman e à Poca, pelo apoio fora da faculdade.

À Letícia, pela ajuda emocional, que foi muito importante para a conclusão de mais um trabalho e para a continuidade da minha caminhada.

Aos bezerras, Veadinha e Mussum, e ao carneiro Zulu, por contribuírem involuntariamente para esta pesquisa. A esses animais dedico todo o meu respeito.

Finalmente, aos veadinhos, animais que aprendi a admirar e amar. Espero que meus trabalhos contribuam para o seu bem-estar.

“Amar os animais é aprendizado de humanidade”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

Os cervídeos são ruminantes selvagens que estão em contato com os ruminantes domésticos em várias regiões do Brasil, facilitando, assim, o trânsito de patógenos entre os dois grupos. Esse grupo de ruminantes possui espécies ameaçadas de extinção. Em relação aos animais de cativeiro, o trânsito de animais entre zoológicos ou criatórios favorece a introdução de micro-organismos infecciosos em outro plantel. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de hemoparasitos e ectoparasitos em populações de cervídeos brasileiros, já que esse conhecimento é importante para os profissionais envolvidos na preservação e sanidade desses animais, além do papel desses ruminantes como possível reservatório desses agentes infecciosos para os animais domésticos e seres humanos. Foram analisadas amostras sanguíneas de 89 cervídeos, sendo 29 amostras de animais pertencentes ao estado de Minas Gerais (MG) e 60 amostras de Mato Grosso do Sul (MS). As amostras de MS foram de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) de vida livre, e as amostras dos animais de Minas Gerais originaram-se de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) e cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Nas amostras sanguíneas, foi realizada a pesquisa de DNA dos parasitos dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria* e *Trypanosoma*, através de nested ou semi-nested PCR seguido de sequenciamento das amostras positivas. Quanto às riquetsias, dos 29 animais pertencentes ao estado de Minas Gerais, 27 (93,1%) apresentaram-se positivos para espécies de Anaplasmataceae, sendo 79,3% para *A. marginale*, 17,2% para *Anaplasma* spp. (similaridade com *A. phagocytophilum* e *A. platys*), 3,4% para *E. chaffeensis* e 3,4% para *A. bovis*. Dos 60 veados-campeiros do MS, 29 (48,3%) foram positivos para *A. marginale*. Na pesquisa de hemoprotozoários, 72,4% dos cervídeos de Minas Gerais estavam infectados. Desses, 80,9% por *Theileria cervi*, 9,5% por *Theileria* sp., 4,7% por *B. bovis* e um 4,7% por *B. bigemina*. Dos cervídeos do Mato Grosso do Sul, 38,3% foram positivos. Desses, 52,2% para *T. cervi*, 8,7% para *B. bigemina*, 13,0% para *B. bovis* e 10,0% não obtiveram sucesso no sequenciamento. *Trypanosoma evansi* foi detectado em 24,1% dos 29 cervídeos de Minas Gerais e em 18,3% dos veados-campeiros do Mato Grosso do Sul. Nenhum animal foi positivo para *T. vivax*. Além dos hemoparasitos, nos animais de MG foram detectados carrapatos das espécies *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, além de pulgas da espécie *Rhopalopsyllus lugubris lugubris*, piolhos da espécie *Solenopotes binipilosus* e sarnas do gênero

Psoroptes. Através de análises moleculares, foi verificada a ocorrência de *A. marginale* nas glândulas salivares de carrapatos da espécie *R. microplus*, e foi sugestivo a presença de *Theileria* sp. nas glândulas salivares de carrapatos da espécie *D. nitens*. O cultivo em células IDE8 de *A. marginale* oriundo de cervídeo não apresentou estabelecimento efetivo, e as amostras de *A. marginale* oriundas dos cervídeos mostraram baixa virulência ao serem inoculadas em ruminantes domésticos. De acordo com a literatura pesquisada, o presente trabalho envolve os primeiros registros de parasitos da espécie *A. bovis* em cervídeos brasileiros e de *Theileria* spp. neles e em carrapatos *D. nitens* que parasitavam esses animais, sendo que foi observada uma alta percentagem de animais infectados por *Theileria*.

ABSTRACT

Changes in different ecosystems caused wild deer to come to live in proximity to other ruminants, favoring the movement of pathogens between the two groups. For animals in captivity, the movement of animals between zoos or farms favors the introduction of infectious microorganisms in other areas. The aim of the present study was to evaluate the occurrences of hemoparasites and ectoparasites in deer populations, since this knowledge is important for professionals involved in the preservation and health of these animals, and to evaluate their role as a possible reservoir of these infectious agents to domestic animals and humans. Blood samples from 89 Brazilian deer were evaluate, and 29 samples of the *Mazama gouazoubira* and *Blastocerus dichotomus* from the State of Minas Gerais (MG) and 60 samples of the *Ozotocerus bezoarticus* from the State of Mato Grosso do Sul (MS). The MS samples were pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) free-living animals and samples of Minas Gerais were derived from Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and the marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). In blood samples, was investigated DNA of parasites belonging to the genera *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria* and *Trypanosoma*, using nested or semi-nested PCR followed by sequencing of positive samples. As for the rickettsiae of 29 animals belonging to the state of Minas Gerais, 27 (93.1%) were positive for species of Anaplasmataceae, being 79.3% for *A. marginale*, 17.2% for *Anaplasma* spp. (Similarity with *A. phagocytophilum* and *A. platys*), 3.4% for *E. chaffeensis* and 3.4% for *A. bovis*. Of the 60 pampas deer MS, 29 (48.3%) were positive for *A. marginale*. The search for hemoprotozoa in deer from Minas Gerais, showed that 72.4% of the animals were infected. These positive animals, 80.9% with *Theileria cervi*, 9.5% with *Theileria* sp., 4.7% with *B. bovis* and 4.7% with *B. bigemina*. In cervids from Mato Grosso do Sul, 38.3% were positive, with 52.2% for *T. cervical*, 8.7% for *B. bigemina*, 13.0% for *B. bovis* and 10.0% were not successfully sequenced, and therefore not identified. *Trypanosoma evansi* was detected in 24.1% of 29 deer in Minas Gerais and in 18.3% of pampas deer in Mato Grosso do Sul. No animals were positive for *T. vivax*. The presence of ectoparasites were also investigated in deer from Minas Gerais. The ticks found were the species *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, fleas of the specie *Rhopalopsyllus lugubris lugubris*, lice of the specie *Solenopotes binipilosus* and mite of the genus *Psoroptes*. Through molecular analysis, it was verified the presence of *A. marginale* in salivary

glands of ticks of the species *R. microplus*. The attempts to establish the specie *A. marginale* originated from deer in IDE8 cells, did not succeed. *Anaplasma marginale* from deer presented low virulence to domestic ruminants. Taken together the results presented in this work consist the first report concerning the occurrence of *A. bovis* and *Theileria* spp. in Brazilian cervids with a high prevalence of *Theileria* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** Organograma esquematizando a metodologia utilizada no presente estudo.....35
- FIGURA 2:** Análise dos produtos da nPCR em gel de agarose 1% corado com Gel Red. Primers: 1º reação: RIB19/RIB20; 2º reação: BabRumF/BabRumR. 1- Peso molecular (banda alvo: 430 pb); 2- Controle positivo *B. bovis/B. bigemina*; 3 a 6 – glândulas salivares de carrapatos parasitando cervídeos, sendo: 3- MGI19/ *A. cajennense*; 4- MGI8/*D. nitens*; 5- MGI9/ *B. microplus*; 6- MGI9/ *D. nitens*; 7- branco da 1º reação; 8- branco da 2º reação.....67
- FIGURA 3:** Ectoparasitos encontrados em cervídeos, pertencentes ao estado de Minas Gerais. A: piolho fêmea da espécie *S. binipilosus*; B: Pulga fêmea do gênero *Rhopalopsyllus*; C: dois espécimes de sarna copulando, sugestivo do gênero *Psoroptes*.....69
- FIGURA 4:** Trofozoíto de *Babesia/Theileria* observado no esfregaço por aposição de baço, do cervídeo MGI12 (Corante: Romanowsky; aumento 100X).....72
- FIGURA 5:** Hemácias parasitadas por hemoprotozoários *Babesia/Theileria* no interior de capilares cerebrais do cervídeo MGI8 (Corante: Romanowsky; aumento 100X).....72
- FIGURA 6:** Análise dos produtos da semi-nPCR em gel de agarose 1% corado com Gel Red. Primers: 1º reação: Te1F/Te1R; 2º reação: Te2F/Te1R. 1- Peso molecular (banda alvo: 219 pb); 2- Controle positivo *T. evansi*; 3 a 6 - espécimes de *O. bezoarticus*, pertencentes ao estado de MS; 7-13 espécimes de *M. gouazoubira*, pertencentes ao estado de MG, sendo: 7- MGE1; 8- MGE2; 9- MGZBH2; 10- MGZBH1; 11- BDZBH1; 12- BDZBH2; 13- BDZBH3; 14- Branco da 1º reação; 15- branco da 2º reação (As bandas com peso molecular superior a 219 pb, são inespecíficas).....73
- FIGURA 7:** Alinhamento das sequências 18S rRNA de *B. bigemina* gb|HQ840960.1|, *B. bovis* gi|156089128| e *T. cervi* gb|HQ184412.1|, através do programa ClustalW2, ilustrando os locais não homólogos entre essas espécies de hemoparasitos. Os locais não homólogos não possuem *.....75
- FIGURA 8.1 E 8.2:** Eletromicrografia de células IDE8 inoculadas com *A. marginale* de *M. gouazoubira* na 16º passagem. **A:** As setas destacam vacúolos contendo estruturas sugestivas de corpúsculos iniciais, sendo que na fig. 8.1 a membrana do vacúolo encontra-se preservada. **B:** As setas destacam vacúolos contendo estruturas sugestivas de corpúsculos iniciais não íntegros, em processo de degeneração.....78
- FIGURA 9:** Análise dos produtos da nested PCR em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio. 1- Peso molecular (banda alvo 294pb); 2- Controle positivo *A. marginale*; 3 a 9 - espécimes de *Mazama gouzoubira* recolhidos pelo IBAMA-MG; 10 e 11- Cultivo de *A. marginale* oriundo de cervídeo em célula IDE8 (4º e 5º passagens); 12- Branco da 1ª reação; 13- branco da 2ª reação.....79
- FIGURA 10A e 10B:** Células IDE8 do cultivo *A. marginale* de *M. gouazoubira* na 22º passagem. Fig A: Observam-se vacúolos com a presença de poucos corpúsculos iniciais (setas). Fig B: Corpúsculos iniciais livres e bem definidos (Coradas com Romanowsky, x100).....80

FIGURA 11: Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com células IDE8 infectadas com <i>A. marginale</i> oriundo de cervídeo, na 25ª passagem. Acima, a reação positiva com fluorescência esverdeada dos corpúsculos no interior das células IDE8 e abaixo a reação negativa.....	80
FIGURA 12: Alinhamento das seqüências 18S rRNA de <i>T. cervi</i> , através do programa ClustalW2, comparando as amostras oriundas de veados-campeiros do MS e a amostra de veado-catingueiro MGI12 de MG. A homologia é representada por * e observada em todos os nucleotídeos.....	83
QUADRO 1: Dados dos cervídeos estudados no período de 2006 a 2010.....	31
QUADRO 2: Seqüência de iniciadores que foram utilizados para identificação dos gêneros de hemoparasitos.....	42
QUADRO 3: Condição para reação de nested PCR para <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp., <i>A. marginale</i> / <i>A. ovis</i> , <i>Ehrlichia</i> spp. monocítica, <i>Trypanosoma vivax</i> e <i>T. evansi</i> , usando os primers RIB19/20, MSP45/3, NS16SCH1F/R, Tvi2/DTO156, Te1F/R (primeira reação) e BabRumF/R, AnapF/R, NS16SCH2F/R e Te2F/1R (segunda reação), respectivamente.....	43
QUADRO 4: Condição para reação de nested PCR para <i>A. marginale</i> (Am) e <i>Ehrlichia</i> granulocítica (EG) usando os primers MSP1aP/3, Ge3a/10r (primeira reação) e MSP1aNF/R e Ge2/9f (segunda reação).....	43
QUADRO 5: Programas submetidos ao termociclador automático para realização do nested PCR para amplificação para <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp., <i>A. marginale</i> / <i>A. ovis</i> , <i>Ehrlichia</i> spp. monocítica, <i>Trypanosoma vivax</i> e <i>T. evansi</i> usando os primers RIB19/20, MSP45/3, NS16SCH1F/R, Tvi/DTO156 e Te1F/R (primeira reação) e BabRumF/R, AnapF/R, NS16SCH2F/R e Te2F/1R (segunda reação).....	43
QUADRO 6: Programas usados para realização do nested PCR para amplificação de <i>A. marginale</i> (Am) e <i>Ehrlichia</i> granulocítica (EG) usando os primers MSP1aP/3, Ge3a/10r (primeira reação) e MSP1aNF/R e Ge2/9f (segunda reação).....	44

LISTA DE TABELAS

1- Frequência de infecção por hemoprotozoários nos cervídeos do estado de Minas Gerais, capturados em 2010, conforme a origem ou a espécie do animal.....	65
2- Frequência da infestação por ixodídeos em <i>M. gouazoubira</i> , pertencentes ao estado de Minas Gerais, capturados em 2010, conforme a origem do animal.....	66
3- Resultado do exame da hemolinfa, nPCR e sequenciamento nucleotídico das glândulas salivares dos carrapatos oriundos dos cervídeos de vida livre, capturados de 2007 a 2010, pertencentes ao estado de Minas Gerais.....	68
4- Resultado dos esfregaços por aposição e nPCR realizado em órgãos obtidos na necropsia dos cervídeos de vida livre, pertencentes ao estado de Minas Gerais e capturados no período de 2007 a 2010.....	71
5- Resultado da presença de hemoparasitos encontrados nas amostras dos cervídeos, pertencentes ao estado de Minas Gerais. Os animais destacados em negrito são aqueles em que a coinfeção foi detectada.....	74
6- Frequência da infecção por hemoparasitos em veados-campeiros pertencentes ao estado de Mato Grosso do Sul e capturados no ano de 2006, parasitados por hemoparasitos e divididos conforme sexo e faixa etária do animal.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD = Demanda bioquímica de oxigênio
CETAS = Centro de Triagem de Animais Silvestres
DMSO = Dimetil Sulfóxido
DNA = Ácido Desoxirribonucléico
dNTP = deoxinucleosídeo trifosfato
DPI = Dias após a inoculação
EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGH = Erliquiose Granulocítica Humana
EMH = Erliquiose Monocítica Humana
EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EV = Endovenosa
g = Gravidade
g = Gramas
mg = Miligrama
kg = Quilograma
IBAMA = Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDE8 = linhagem de células embrionárias oriundas do carrapato *Ixodes scapularis*
IM = Intramuscular
L = Litro
L-15B = Meio Leibovitz (meio de cultivo)
LBC = Lipoproteína Bovina Concentrada
MET = Microscopia eletrônica de transmissão
MGI = *Mazama gouazoubira* apreendido pelo IBAMA
MGE = *Mazama gouazoubira* pertencente à Fazenda Engenho-d'água
MGZBH = *Mazama gouazoubira* pertencente à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte
BDZBH = *Blastocerus dichotomus* pertencente à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte
OBMS = *Ozotocerus bezoarticus* pertencente ao estado de Mato Grosso do Sul
ml = Mililitro
μl = Microlitro
M = Molar
Min = Minuto
mM = milimolar
MSP = Proteína Principal de Superfície
pb = Pares de base
PBS = *Phosphate Buffered Saline*
PCR = *Polimerase Chain Reaction*
PCV = *Packet Cell Volume* (= volume globular)
RIFI = Reação de imunofluorescência indireta
SFB = Soro fetal bovino
Syto 16 = *Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains*
TA = Temperatura ambiente
TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq = Taq DNA Polimerase - enzima termoestável recombinante da bactéria *Thermus aquaticus*
U = Unidade
UR = Umidade relativa

VG= Volume globular, hematócrito
Zoo = Fundação Zoobotânica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Cervídeos.....	6
2.2 Hemoparasitoses	8
2.2.1 Família Anaplasmataceae.....	8
2.2.1.1 <i>Anaplasma</i>	10
2.2.1.2 Cultivo de riquetsias em células embrionárias de carrapato	13
2.2.1.3 <i>Ehrlichia</i>	14
2.2.2 Ordem Piropasmida.....	16
2.2.2.1 <i>Babesia</i>	16
2.2.2.2 <i>Theileria</i>	18
2.2.3 <i>Trypanosoma</i>	21
2.2.4 Diagnóstico de hemoparasitoses através de métodos moleculares.....	23
2.2.5 Alvos para o diagnóstico molecular.....	24
2.2.6 Uso de citometria de fluxo na avaliação da parasitemia.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais estudados.....	31
4.1.1 Origem dos animais estudados.....	31
4.1.2 Coleta de amostras sanguíneas.....	33
4.1.2.1 Animais de cativeiro.....	33
4.1.2.2 Animais de vida livre.....	34
4.1.2.3 Coleta de animais em exame necroscópico.....	35
4.1.4 Locais de realização do estudo laboratorial.....	35

4.2 Processamentos das amostras.....	35
4.3 Inoculações de sangue de cervídeos em ruminantes domésticos.....	37
4.3.1 Isolamento de amostras e cultivo de <i>A. marginale</i> em células IDE8.....	37
4.3.2 Citometria de fluxo para detecção de parasitemia.....	38
4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	39
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	40
4.6.1 Extração de DNA.....	40
4.6.2 Amplificação do DNA por nested ou semi-nested PCR.....	41
4.6.2.1 Amplificação do DNA.....	47
4.7 Sequenciamento nucleotídico de <i>Anaplasma</i> , <i>Ehrlichia</i> , <i>Babesia</i> , <i>Theileria</i> e <i>Trypanosoma</i>	44
4.7.1 Análise das sequências em bancos de dados.....	46
4.8 Estudo da transmissão dos hemoparasitos pelos carrapatos.....	46
4.9 Metodologia de apresentação dos resultados.....	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Resultados dos animais oriundos de Minas Gerais.....	50
5.1.1 Ordem Piropasmida (<i>Babesia</i> spp. e <i>Theileria</i> spp.).....	50
5.1.1.1 Detection of <i>Theileria</i> and <i>Babesia</i> in brown brocket deer (<i>Mazama gouazoubira</i>) and marsh deer (<i>Blastocerus dichotomus</i>) in the State of Minas Gerais, Brazil.....	50
5.1.2 Família Anaplasmatataceae	56
5.1.2.1 Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmatataceae in brazilian brown brocket deer (<i>Mazama gouazoubira</i> , Fischer, 1814) and marsh deer (<i>Blastocerus dichotomus</i> , Illiger, 1815).....	56
5.1.3 Resultados e discussão que não constam nos artigos publicados.....	64
5.1.3.1 Detecção de hemoprotozoários e ixodídeos em cervídeos capturados após submissão do artigo do item 5.1.1.1.....	64
5.1.3.2 Estudo da transmissão dos hemoparasitos pelos ixodídeos.....	66

5.1.3.3 Outros ectoparasitos encontrados.....	68
5.1.3.4 Animais necropsiados.....	69
5.1.3.5 Infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.....	73
5.1.3.6 Coinfecção por hemoparasitos.....	73
5.1.3.7 Inoculação de ruminantes domésticos com amostras de <i>A. marginale</i> oriundas de cervídeos.....	75
5.1.3.8 Isolamento e cultivo de <i>A. marginale</i> em células IDE8 infectadas com amostra de <i>A. marginale</i> oriunda de cervídeo.....	77
5.2 Resultados do material de <i>O. bezoarticus</i> oriundos de Mato Grosso de Sul.....	81
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	85
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As hemoparasitoses constituem um amplo grupo de parasitos sanguíneos que afetam os animais domésticos e silvestres. As infecções por esses parasitos assumem importância na saúde animal por ocasionarem patologias variadas, podendo, inclusive, levar à morte, além da possibilidade da transmissão zoonótica (Losos 1986).

No Brasil, alguns dos gêneros de hemoparasitos que afetam ruminantes são: *Anaplasma* (Barros et al. 2005), *Babesia* (Barros et al. 2005), *Ehrlichia* (Machado et al. 2006b) e *Trypanosoma* (Madruga 2004). As tripanosomíases e anaplasmoses podem ser transmitidas mecanicamente por dípteros hematófagos (Gardiner 1989; Madruga 2004). Anaplasmoses, babesioses e erliquioses são transmitidas por secreções salivares de ixodídeos fixados aos hospedeiros vertebrados (Cohn 2003; Barros et al. 2005; Machado et al. 2006b). Embora 90% das espécies de ixodídeos sejam encontradas exclusivamente em animais silvestres, existem poucos estudos sobre a ecologia e a epidemiologia de doenças transmitidas por esses vetores (Camargo-Neves et al. 2004).

Dentre os hemoprotozoários da família Trypanosomatidae (Grobber 1905), *Trypanosoma vivax* (Chalmers 1918) e *Trypanosoma evansi* (Steel 1885) podem parasitar cervídeos na América do Sul (Soulsby 1986). A tripanosomíase bovina causada por *T. vivax* é considerada uma enfermidade importante do ponto de vista econômico em países da América Latina (Otte et al. 1994). Em bovinos, essa doença pode manifestar-se de forma aguda, crônica ou assintomática, e cervídeos são considerados reservatórios de *T. vivax*. *Trypanosoma evansi* produz sinais clínicos mais severos em equinos, mas ruminantes domésticos e silvestres são possíveis reservatórios desse agente (Soulsby 1986). A grande persistência e os altos níveis de parasitemia indicam que esse cervídeo é um bom reservatório de *T. evansi* (Reid et al. 1999).

Existem relatos da presença de hemoprotozoários da classe Piroplasmida em cervídeos (Ristic 1988; Cantu et al. 2007). Em estudos sorológicos no Brasil, foi observado que em cervos-do-pantanal de Porto Primavera, SP, 88,2% e 92% dos animais estavam reativos para *Babesia bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Veados-campeiros do Pantanal apresentaram positividade em testes sorológicos de 11,8% tanto para *B. bovis* quanto para *B. bigemina* (Duarte 2007). Theileriose é uma doença parasitária transmitida por carrapatos causada por diferentes espécies de *Theileria*. Apenas alguns dos membros desse gênero são patogênicos, enquanto outros são considerados moderadamente patogênicos ou benignos (Brown 1990). No entanto, pouco se sabe sobre a epidemiologia da doença em ruminantes selvagens.

Acredita-se que eles podem atuar como reservatórios e ser responsáveis tanto pela manutenção do parasito como de carrapatos e, assim, prejudicar os esforços para eliminar a doença em populações de animais domésticos (Höfle et al. 2004).

Dentro do grupo das riquetsioses existem dois gêneros da família Anaplasmataceae que têm importância médica e veterinária e são relatados em ruminantes silvestres nas Américas. São eles: *Anaplasma* e *Ehrlichia*. Os cervídeos são discriminados como reservatórios de *Anaplasma*, desenvolvendo uma doença branda com infecção persistente (Stuen et al. 2008). Kutler (1984), em uma revisão sobre anaplasmoze em ruminantes domésticos e silvestres, levanta a possibilidade de que as anaplasmoses sejam espécie-específicas e podem ou não infectar bovinos. Por isso, torna-se importante um estudo filogenético das espécies, do mesmo gênero, de micro-organismo que acometem mamíferos domesticados e selvagens.

A entidade ambientalista “Wildlife Conservation Society” (WSC) listou alguns patógenos com alto potencial de propagação, como consequência das mudanças na temperatura e na precipitação vinculadas ao aquecimento global. Dentre eles, encontra-se o hemoprotozoário *Babesia* spp. (Pesquisa FAPESP 2008).

Malan et al. (1997) destacam que o conhecimento adquirido pelo estudo das interações entre os parasitos dos animais selvagens, domésticos e seu meio ambiente pode ser a chave para o sucesso da pecuária rentável no futuro. Além disso, consideram que os parasitos, outros agentes infecciosos, hospedeiros externos e outros elementos que não são indígenas para o ecossistema são estrangeiros e devem, na medida do possível, ser excluídos.

A estrita convivência entre ruminantes domésticos e silvestres, comum em várias regiões de criação extensiva de bovinos no Brasil, pode ocasionar risco de infecção por hemoparasitos, transmitidos por ectoparasitos, tanto para os ruminantes domésticos quanto para os ruminantes silvestres, que podem tornar-se susceptíveis ou reservatórios desses micro-organismos (Duarte 2006). Além disso, a relação homem e animal vem se estreitando com os movimentos crescentes de contato com a natureza e preservação e, com isso, espera-se que um número maior de indivíduos possa adquirir doenças oriundas dos animais silvestres, como, por exemplo, as erliquioses (Machado 2006b). *Ehrlichia chaffeensis* é responsável pela erliquiose monocítica humana (HME) e já foi detectada em cervídeos americanos (Little et al. 1998; Machado et al. 2006a).

Cervídeos podem ser infectados por várias espécies de hemoparasitos e reações cruzadas entre testes sorológicos podem acontecer, principalmente para espécies de micro-organismos do mesmo gênero (Machado et al. 2006a). Por esse motivo, os testes moleculares para detecção direta são recomendados. No Brasil, não existem amostras de hemoparasitos isoladas de populações de cervídeos.

Devido à importância dos hemoparasitos, este trabalho foi desenvolvido no Departamento de parasitologia da UFMG, pelo grupo de pesquisa sobre parasitoses em animais silvestres, para pesquisar a presença de *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. e *Trypanosoma* spp., em populações de cervídeos brasileiros, já que poucos são os estudos que abordam a presença de hemoparasitos nesses animais e seu conhecimento torna-se importante para sua preservação e sanidade, além de esclarecer o papel desses ruminantes como possíveis reservatórios desses agentes infecciosos para os animais domésticos e para o ser humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cervídeos

Cervídeos são mamíferos da ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia (Duarte 1997). Representam o grupo de ruminantes selvagens mais bem distribuído em todo o mundo, habitando quase todos os continentes, exceto a Antártida (Van Soest 1994) e algumas regiões da África (Duarte 2012, Comunicação pessoal). No Brasil, são descritos quatro gêneros desses animais. O gênero *Mazama* (Rafinesque 1817) possui as seguintes espécies: *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*; o gênero *Blastocerus*; a espécie *B. Dichotomus*; o gênero *Odocoileus*; a espécie *O. virginianus* e o gênero *Ozotocerus*; a espécie *O. bezoarticus* (Duarte 2006). Essas espécies existentes no país vêm apresentando um declínio populacional devido à perda de habitats, a caças indiscriminadas e a doenças. Algumas dessas espécies encontram-se na lista vermelha de animais ameaçados de extinção da União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN (IUCN 2011).

O gênero *Mazama* inclui-se no grupo dos pequenos cervídeos florestais solitários (15 a 40 Kg) (Vogliotti 2003). Habitam regiões de clima quente e úmido, como as matas densas que margeiam os rios, e podem ser encontrados praticamente em todos os ambientes florestais neotropicais, podendo ser descritos em todo o território brasileiro (Duarte 1996). São animais de hábitos solitários, que procuram se esconder em áreas de densa vegetação, para onde fogem quando se sentem ameaçados. Por isso, a captura desses animais em vida livre torna-se difícil e, conseqüentemente, os estudos em seu ambiente natural (Barrette 1987; Vogliotti 2003). *M. gouazoubira*, popularmente conhecido como veado-catingueiro ou veado-virá, possui uma pelagem marrom-acinzentada e geralmente apresenta um filhote por cria (Pinder e Leeuwenberg 1997). Vogliotti (2003) pesquisou os aspectos etnozoológicos dos veados da Serra do Paranapiabaca, SP, através de entrevistas realizadas com os moradores locais. Os habitantes da região relataram que o veado-catingueiro é encontrado em ambientes antropizados como as áreas de fisionomia pouco densas, como o cerrado e samambaias, capoeiras, bordas de matas, plantações e pastagens.

Ozotoceros bezoarticus, conhecido popularmente como veado-campeiro, é um cervídeo de porte médio com peso aproximado de 30 Kg e o único representante do gênero *Ozotocerus* no Brasil. É uma espécie que habita preferencialmente campos, mas pode ser encontrado em ambientes de cerrado aberto. Ao contrário de *M. gouazoubira*, não é achado em regiões de

florestas. Atualmente no Brasil, é encontrado no centro de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, sul do Pará e o Rio Grande do Sul (Merino et al. 1997).

O cervo-do-pantanal, *Blastocerus dichotomus*, é característico de áreas inundáveis e outras áreas úmidas da América do Sul. É a maior espécie de cervídeo sul americano, podendo pesar até 150Kg (Pinder 1996). Essa espécie tem sido alvo de caçadores e está ameaçada de desaparecimento nos estados brasileiros de São Paulo, Paraná, Goiás, sul do Amazonas e Minas Gerais. Atualmente, em Minas Gerais, apresenta indivíduos residentes no Parque Nacional Grande Sertão Veredas (Tomas et al. 1997). Outras ameaças às populações desses cervídeos são as doenças introduzidas por bovinos, como a babesiose, a aftosa e a brucelose (Duarte 2007). A drenagem de várzeas e outras áreas úmidas para projetos de agricultura e a construção de grandes usinas hidroelétricas eliminam habitats marginais e resultam no desaparecimento de subpopulações de cervo-do-pantanal (Pinder 1996).

Algumas espécies de ruminantes selvagens não se adaptam bem à presença humana e se deslocam de seu habitat, são caçados ou levados para zoológicos ou parques (Barbosa 2003). Já outras espécies coexistem bem com humanos, alimentando-se em áreas agrícolas e se protegendo em áreas de reserva de mata próximas a esses locais. No Brasil, *M. gouazoubira* é encontrado em ambientes antropizados, inclusive em pastos (Vogliotti 2003). Já a população de *O. bezoarticus* tem diminuído rapidamente devido à ocupação de campos e cerrados pela agropecuária, fragmentação e alteração de seu habitat (Merino et al. 1997). Pinder (1997), estudando áreas de ocupação comum pelo veado-catingueiro, veado-campeiro e rebanhos de bovino no Pantanal brasileiro, concluiu que as três espécies não competem por forragens por preferirem plantas diferentes para se alimentar. Isso indica que a convivência comum dessas espécies no mesmo habitat é bastante facilitada por não serem competidoras de alimento.

Outra situação diferente dos animais de vida livre são os animais criados em cativeiro, que estão sujeitos a várias situações estressantes que podem acarretar uma imunossupressão (Fowler 2000). O estudo realizado por Höfle et al. (2004) em “Red deer” (*Cervus elaphus*) translocados da Alemanha para a Espanha ilustrou que em animais translocados a exposição a novos agentes patogênicos aos quais o hospedeiro não está adaptado, especialmente sob condições extremas, pode levar a efeitos graves e, eventualmente, à morte do animal. Isso sublinha a necessidade de incluir a adaptação às condições locais e de agentes patogênicos nos processos de translocação. Além disso, afirma que em algumas espécies, o benefício da

translocação de animais pode até ser questionável quando os riscos associados com a exposição aos patógenos locais são considerados. Essa situação pode levar ao aparecimento de sintomas clínicos causados por micro-organismos que se encontravam em estado de latência.

A translocação entre animais selvagens causa o risco de introdução de patógenos e, por isso, são recomendados quarentena e protocolos de triagem desses animais, quando são translocados para um ambiente natural ou de cativeiro. Uma série de publicações e incidentes prova a preocupação a respeito dos perigos da circulação de animais silvestres entre diferentes áreas geográficas, uma vez que esses animais podem atuar como prováveis vetores de parasitos e de doenças infectocontagiosas. Além disso, os animais translocados podem adquirir doenças infecciosas endêmicas do local para onde foram transportados, contra as quais eles podem não ter defesa (Höfle et al. 2004). Por isso, a pesquisa desses patógenos em animais de cativeiro torna-se importante para a translocação de animais entre zoológicos ou criatórios, para não introdução de micro-organismos infecciosos em outro plantel.

Como os cervídeos são animais considerados presas, eles evoluíram para não demonstrar aos seus predadores sinais de doenças, o que torna o exame clínico difícil para o médico veterinário (Duarte 2006). Por isso, exames laboratoriais como a hematologia e testes diagnósticos diretos e indiretos para procura de agentes infecciosos tornam-se importantes para a consecução do diagnóstico nesses animais. Além disso, o diagnóstico de infecções é relevante para o conhecimento da prevalência do agente infeccioso de cervídeos em determinadas regiões e posteriores estudos sobre a relevância da presença desses agentes, em ruminantes silvestres, para as populações de ruminantes domésticos e seres humanos que convivem com esses cervídeos.

2.2 Hemoparasitoses

2.2.1 Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae é composta por bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que se multiplicam no interior de vacúolos formados pela membrana da célula do hospedeiro vertebrado e são classificadas dentro de quatro gêneros (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*). De acordo com a análise de similaridade da sequência homóloga do RNA ribossomal 16S rRNA, o gene groESL e genes codificadores de proteínas de superfície, essa família foi dividida em quatro grupos: Grupo *E*.

phagocytophila/Anaplasma (incluindo as espécies *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* e o grupo *A. phagocytophilum* (*Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana – HGE)); Grupo *E.canis/Cowdria* (com as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *C. ruminantium*), Grupo *E. sennetsu/Neorickettsia* (com as espécies *E. sennetsu*, *E. risticii*, *N. helminthoeca*) e as espécies de *Wolbachia* (Dumler et al. 2001).

As espécies dos grupos *E. phagocytophila/Anaplasma* e *E.canis/Cowdria* podem ser transmitidas por carrapatos, e algumas delas infectam ruminantes selvagens e domésticos, apresentando, assim, interesse para o presente estudo.

2.2.1.1 *Anaplasma*

Anaplasmosose é uma doença que afeta ruminantes e faz parte do complexo da tristeza parasitária bovina (McCosker 1981). É causada por riquetsias da família Anaplasmataceae, ordem Riquetsiales e gênero *Anaplasma*, e são patógenos intraeritrocitários obrigatórios (Losos 1986). O gênero *Anaplasma* foi descrito por Arnold Theiler em 1910 através do reconhecimento de pontos marginais encontrados em eritrócitos de bovinos doentes causando uma doença específica (Theiler 1910).

Trata-se de uma anemia hemolítica sem hemoglobinúria e os sinais clínicos aparecem repentinamente, após o estabelecimento da parasitemia. A anemia é resultado da grande destruição extravascular dos eritrócitos parasitados e não parasitados, presentes na medula óssea e principalmente no baço (Schalm 1986). Em animais esplenectomizados, o micro-organismo é mais virulento, pois o baço é o órgão de controle do nível de infecção (Losos 1986).

Anaplasma marginale tem distribuição cosmopolita, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Anaplasmosose bovina é endêmica nos Estados Unidos, México, América Central e do Sul e Ilhas do Caribe. É uma doença enzoótica na maioria dos países da América Latina, com exceção de áreas de deserto ou montanhas como os Andes (Guglielmone 1995).

A transmissão da anaplasmosose ocorre mecanicamente por picada de moscas e através de fômites contaminados com sangue infectado ou, biologicamente, através de carrapatos (Dikmans 1950; Ewing 1981). Entretanto, algumas amostras não são infectantes ou transmitidas por carrapatos (Kocan et al. 2004)

Os agentes causadores de anaplasmosose em ruminantes domésticos são: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* e *A. ovis* (Kuttler 1984). Em ruminantes selvagens já foram identificados na América do Sul: *A. marginale* (Machado et al. 2006a); América do Norte: *A. marginale* e *A. centrale*; na Ásia e na África *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*; na Europa *A. phagocytophilum*, *A. marginale* e *A. ovis* (Kuttler 1984; de la Fuente et al. 2008; Stuen et al. 2008).

O ciclo biológico do *A. marginale* foi descrito através da observação da alimentação de carrapatos machos da espécie *Dermacentor andersoni*. Esses espécimes alimentam-se de sangue contendo eritrócitos parasitados por *A. marginale*. Esse micro-organismo multiplica-

se nas células epiteliais intestinais do ixodídeo, passando, em seguida, para hemolinfa. Posteriormente, infectam vários tecidos do carrapato, incluindo as glândulas salivares. A transmissão para um hospedeiro susceptível ocorre durante a realização de um novo repasto sanguíneo pelo invertebrado (Kocan 1986; Kocan et al. 1992; Ge et al. 1996). No hospedeiro vertebrado, *A. marginale* ocorre exclusivamente no interior de eritrócitos dentro de vacúolos, onde corpúsculos iniciais se multiplicam por divisão binária (Ristic & Carson 1977). O período de incubação é de 28 dias em média, variando de sete a 60 dias dependendo do número de organismos da dose infectante (Kocan et al. 2003). As células parasitadas são removidas da circulação pelo sistema monocítico fagocitário do animal, causando uma anemia branda a grave e icterícia (Richey 1981).

A transmissão biológica de *A. marginale* através de carrapatos tem importância epidemiológica transestadialmente ou intraestadialmente, enquanto a transmissão transovariana parece ser esporádica (Stich et al. 1989; Ribeiro et al. 1996). Em regiões tropicais e subtropicais, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem sido considerado o principal vetor biológico de *A. marginale* (Alonso et al. 1992). A infecção por esse agente também pode ser transmitida entre diferentes espécies de ruminantes, como de cervos para o bovino e do bovino para os cervos (Schalm 1986).

Anaplasma ovis em ovinos e caprinos causa uma doença branda, caracterizada por febre baixa, variáveis índices de anemia, icterícia e pode ser acompanhada de distúrbios digestivos (Losos 1986). Os cervídeos são discriminados como reservatórios de *Anaplasma*, desenvolvendo uma doença branda com infecção persistente. Kreier & Ristic (1963) inocularam experimentalmente *A. ovis* em dois cervos esplenectomizados da espécie *Dama virginiana*. A parasitemia dos animais foi acompanhada através de esfregaços sanguíneos e, após o pico, o sangue desses animais foi inoculado em uma ovelha e um bezerro, respectivamente. Os cervos e a ovelha desenvolveram sinais clínicos de anaplasmoses por *A. ovis*, indicando que além de possível reservatório, esses cervídeos também apresentam sinais clínicos da infecção.

Kutler (1984), em uma revisão sobre anaplasmoses em ruminantes domésticos e silvestres, relatou que infecção por *Anaplasma* em cervos da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) é amplamente estudada. Este animal pode ser facilmente infectado tanto por *A. marginale*, quanto por *A. ovis* (Kreier & Ristic 1963), mas apresenta sinais clínicos brandos e pode carrear a infecção por um longo período (Kutler et al. 1967). Cervos da cauda branca do

sudoeste dos E.U.A. foram infectados experimentalmente por *A. marginale*, e foi observado que esses animais parecem não estar expostos naturalmente a esse agente, mesmo em áreas enzoóticas. Esses cervos experimentalmente infectados não desenvolveram parasitemia suficiente para a efetiva transmissão mecânica por moscas hematófagas (Keel et al. 1995).

Zaug et al. (1996) estudaram a susceptibilidade de cervos nobre (*Cervus elaphus*) para as espécies *A. marginale* e *A. ovis* através de infecção experimental e de passagens sucessivas do agente por bovinos e ovinos domésticos esplenectomizados, respectivamente. Tanto para *A. marginale* quanto para *A. ovis* a infecção foi subclínica.

Anaplasma phagocytophilum infecta ruminantes, cães, cavalos, pequenos roedores e humanos (Dumler et al. 2001). É o agente responsável pela anaplasmoose granulocitotrópica em humanos (Losos 1986). Stuen et al. (2008) inocularam cordeiros com amostras de *A. phagocytophilum* isolada de *Cervus elaphus*. Eles observaram que esses animais reagiram com febre, parasitemia e neutropenia, e concluíram que esse cervídeo pode funcionar como reservatório de *A. phagocytophilum*.

No Brasil, Picoloto et al. (2010) compararam os testes PCR padrão e PCR em tempo real (RT-PCR) para o estudo da incidência de *A. marginale* em 43 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) do Pantanal. A PCR padrão detectou apenas um dos cervídeos positivo (2,3%), enquanto que a PCR em tempo real evidenciou positividade em sete animais (16,3%), indicando que a RT-PCR tem uma sensibilidade significativamente maior, portanto, mais apropriada para estudos epidemiológicos.

Vacinas vivas para o controle de anaplasmoose envolvem a inoculação no bovino com eritrócitos infectados por *A. centrale* ou amostras atenuadas de *A. marginale* (Kocan et al. 2010). Os animais que recebem a amostra atenuada apresentam uma infecção persistente, sem desenvolvimento de sintomas clínicos, induzindo uma imunidade protetora persistente (Ristic & Carson 1977).

Vacinas com amostras de *A. marginale* atenuadas podem ser realizadas através de várias passagens em cervos e carneiros (Kuttler 1984; Kuttler & Zaugg 1988). Patógenos isolados de ruminantes selvagens originaram uma infecção branda em bovinos, sugerindo o aparecimento de uma resposta imune protetora contra amostras de *A. marginale* oriundas de outros bovinos (Kuttler 1984). Porém, o uso de inóculo de sangue pode ser arriscado por poder carrear vários outros hemoparasitos como *Babesia*, *Trypanosoma*, além de bactérias

como *Brucella* e *Mycobacterium*, e de vírus como da diarreia bovina a vírus e leucose bovina (Rogers et al. 1988).

2.2.1.2 Cultivo de riquetsias em células embrionárias de carrapato

Uma das alternativas para abolir a transmissão de outros patógenos através de vacinas de eritrócitos é o uso de amostras de baixa patogenicidade oriundas de cultivo celular. Até a década de 90, o isolamento e multiplicação das riquetsias da família Anaplasmataceae era realizado apenas através de inoculações em animais experimentais susceptíveis. O cultivo de células de carrapato vem sendo utilizado para a produção de antígenos, pois quando comparado à infecção experimental de animais susceptíveis, apresenta vantagens. Dentre elas, o controle rigoroso do ambiente, a possibilidade de caracterização e homogeneização de amostras, além do favorecimento das questões éticas, por eliminarem o uso de animais experimentais (Bastos et al. 2006). Somado a isso, o cultivo *in vitro* de patógenos isolados de animais silvestres torna-se importante pela dificuldade da manutenção desses animais em cativeiro para estudos experimentais e liberação desses estudos por parte das autoridades ambientais.

Células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* foram estabelecidas em cultivo e apresenta uma linhagem contínua denominada IDE8, que constitui o primeiro sistema contínuo de *A. marginale* em cultura celular (Munderloh et al. 1994). *Anaplasma marginale* é um dos patógenos que apresenta um bom estabelecimento em IDE8 e, durante o desenvolvimento nessas células, apresenta semelhança morfológica e similaridade com o ciclo de desenvolvimento observado nas células epiteliais do intestino de carrapatos (Blouin & Kocan, 1998). O cultivo de células IDE8 foi implantado no Brasil em 2004. O estabelecimento da IDE8 nas condições brasileiras (Bastos 2005; Bastos et al. 2006; 2007), foi o passo fundamental para a realização do primeiro cultivo *in vitro* de uma amostra brasileira de *A. marginale* nessa linhagem celular (Bastos et al. 2009). As condições de manutenção e criopreservação dessa linhagem celular foram adaptadas e aprimoradas (Bastos 2005; Bastos et al. 2006) e dois isolados de amostras brasileiras de *A. marginale* (UFMG1 e UFMG2) vêm sendo mantidos no Laboratório de Protozoologia Veterinária do ICB/UFMG (Bastos et al. 2010).

Anaplasma sp. oriundos de Cervos da cauda branca já foram isolados por meio de cultura em célula embrionária de carrapato, ISE6. Para isso, amostras sanguíneas positivas para

múltiplas espécies da família Anaplasmataceae, de espécimes selvagens desses cervídeos, foram inoculados em cervos-da-cauda-branca mantidos em condições experimentais. Para o acompanhamento da cultura foram utilizadas a microscopia óptica e eletrônica, técnicas de PCR para identificar o agente e inoculação da cultura em animais livres de infecção. O isolado mostrou-se mais relacionado primeiramente com *A. platys*, seguido de *A. phagocytophilum* (Munderloh et al. 2003).

2.2.1.3 Ehrlichia

O gênero *Ehrlichia* pertence à família Anaplasmataceae e inclui espécies de riquetsias de morfologia similar e são encontradas dentro de vacúolos citoplasmáticos parasitando leucócitos dos animais e do homem (Losos 1986). Existe uma classificação das espécies de *Ehrlichia* de acordo com o tipo celular que ela parasita, embora a mesma espécie desse micro-organismo possa parasitar mais de um tipo celular. Dentre as espécies que infectam monócitos (forma monocítica) encontra-se *E. chaffeensis*, *E. canis* e espécies relacionadas. Na forma granulocítica encontram-se as espécies que infectam granulócitos (*E. ewingii* e genogrupo *A. phagocytophilum*) e na forma trombocítica a espécie *Anaplasma platys* (Cohn 2003).

O ciclo das erliquioses granulocíticas e monocíticas apresenta fases nos hospedeiros intermediários (carrapatos) e definitivos (mamíferos). No hospedeiro definitivo, os micro-organismos multiplicam primeiramente em granulócitos e monócitos, respectivamente. Dentro da célula hospedeira, formam vacúolos derivados da membrana plasmática na qual se multiplicam. Esses patógenos podem incorporar colesterol derivado das células do hospedeiro para ajudar na integridade da membrana. No carrapato, se multiplicam nas células intestinais e das glândulas salivares, não ocorrendo à transmissão transovariana (Lin et al. 2003; Rikihisa 2010).

As erliquioses apresentam ampla distribuição mundial, com focos endêmicos e alguns surtos epidêmicos associados a vetores artrópodes (Moreira 2005). *Ehrlichia chaffeensis* é responsável pela erliquiose monocítica humana e já foi detectada em cervídeos americanos (Little et al. 1998; Machado et al. 2006a). O cervo-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) é apontado como reservatório natural de *E. chaffeensis* na América do Norte (Dawson et al. 1994b). Dawson et al. (1994a) realizaram infecção experimental de *E. chaffeensis* em cervos-da-cauda-branca e observaram a presença desse agente no sangue periférico dos veados por

pelo menos duas semanas após a infecção. Anticorpos contra esse agente foram detectados aproximadamente 10 dias após a inoculação, sendo que os animais não apresentam evidência de doença clínica. Ainda, Davidson et al. (2001), seguindo a infecção experimental de *E. chaffeensis* em cervos-da-cauda-branca, observaram bacteremia durante 24 dias após a inoculação, e todos os animais desenvolveram títulos de anticorpos $\geq 1:64$ no décimo sétimo dia após a infecção, também sem exibição de manifestações clínicas.

Little et al. (1997) desenvolveram um nested PCR para diferenciar as espécies similares a *Ehrlichia* que parasitam o cervo-da-cauda-branca. Nesses cervídeos são encontrados parasitas do genótipo de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* e um micro-organismo denominado “deer *Ehrlichia*-like”, que ainda não foi encontrado em seres humanos. Foram examinadas amostras de 62 cervos pertencentes a dez populações que habitavam quatro estados dos Estados Unidos e observou-se a prevalência de 65% de “deer *Ehrlichia*-like” e a prevalência de 5% de *E. chaffeensis* nessas populações. Também foi realizada a técnica sorológica de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e observou-se que a presença desses anticorpos estava associada à reatividade para “deer *Ehrlichia*-like” no nested PCR, possivelmente resultado de uma reação cruzada entre as diferentes espécies de *Ehrlichia*. Infestações com o carrapato *Amblyomma americanum* também apresentaram correlação positiva com a evidência de “deer *Ehrlichia*-like” no nested PCR, o que pode ser indicativo que este seja um possível vetor desse agente.

Little et al. (1998) detectaram uma coinfeção natural de *E. chaffeensis*, *E. equi* e uma outra espécie similar a *Ehrlichia* em veados-da-cauda-branca nos EUA, através de técnicas sorológicas (RIFI), moleculares (PCR) e cultura. Como se tratam de zoonoses foi sugerido que essa espécie de cervídeo pode ser considerada como uma importante sentinela para determinar a distribuição geográfica desses hemoparasitos.

No Brasil, Machado et al. (2006a) observaram a primeira evidência de *E. chaffeensis* em cervídeos brasileiros. Amostras sanguíneas de sete cervos-do-pantanal capturados nas margens do rio Paraná foram examinadas através da técnica de PCR e nested PCR, para pesquisa de *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *Neorickettsia risticii*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum*. Três amostras foram positivas para *E. chaffeensis* e *A. marginale* e foi sugerido que esse cervídeo representa um reservatório potencial para o agente da erliquiose monocitotrófica humana e para a anaplasmoze bovina em território brasileiro. Posteriormente, foi realizado um estudo sorológico para a procura de anticorpos anti-*E.*

chaffeensis, através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), em cervos-do-pantanal capturados na mesma região e no mesmo período do estudo acima citado. Foram encontradas 80% das amostras positivas, o que enfatiza o papel desses cervídeos como reservatório de *E. chaffeensis* (Sacchi et al. 2008). O mesmo grupo, em outra publicação, testou por RIFI os soros de 143 cervos-do-pantanal da mesma região, e encontraram 116 (81,12%) animais reativos para *A. phagocytophilum* e 24 (16,78%) para *E. chaffeensis* (Sacchi et al. 2009).

2.2.2 Ordem Piroplasmida

2.2.2.1 Babesia

A babesiose representa um grupo de doenças transmitidas por carrapatos, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Babesia*. Essa doença pode ser encontrada de forma aguda, crônica ou inaparente, e quando afeta ruminantes domésticos é responsável por um grande impacto econômico devido às perdas com a morbidade e mortalidade dos animais. Os animais que habitam áreas enzoóticas normalmente são protegidos de infecções naturais no início da vida e a queda dessa proteção depende do nível da infecção inicial. Infecções por *Babesia* podem ser provocadas por uma única ou por várias espécies desse parasito e, além disso, outros hemoparasitos como *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Trypanosoma*, podem estar presentes em infecções concomitantes. A definição das espécies de *Babesia* existentes é dificultada principalmente porque pouco se conhece sobre as espécies desse hemoprotozoário que acometem animais selvagens (Losos 1986).

Babesia spp. são transmitidas por várias espécies de carrapato, ocorrendo a transmissão transovariana, intraestadial e transestadial. A fêmea adulta se infecta nas últimas horas do ingurgitamento. O carrapato ingere sangue contendo hemácias parasitadas com gametócitos. Os oocinetos multiplicam nas células intestinais formando o esporocineto que rompe as células basófilas e caem na hemolinfa. Quando penetram no ovário, ocorre a transmissão transovariana. A larva já possui o esporocineto dormente nas células intestinais e com a alimentação ocorre o estímulo da multiplicação desses esporocinetos que atingem a glândula salivar e diferenciam em esporozoíto (forma infectante). Quando o carrapato infectado se alimenta, os esporozoítos são inoculados no hospedeiro definitivo juntamente com a saliva e penetram imediatamente na hemácia, transformando em trofozoíto que, por divisão binária, origina dois merozoítos que rompem a membrana da hemácia e continua o ciclo em outros eritrócitos (Ristic 1988).

A América Latina é considerada área endêmica para *Babesia* sp., sendo *B. bigemina* (Smith & Kilborne 1893) e *B. bovis* (Babes 1888) as espécies que infectam ruminantes, causando alta morbidade ou mortalidade em bovinos. *Babesia bigemina* e *B. bovis* foram detectadas através de nested PCR em veados-da-cauda-branca de vida livre, no norte do México. Anticorpos também foram detectados através de RIFI nos mesmos espécimes de cervídeos para as mesmas espécies de *Babesia* (Cantu et al. 2007). Deem et al. (2004) não encontraram anticorpos para *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *B. odocoilei* em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) na Bolívia. No Brasil, poucos são os relatos sobre a presença de hemoparasitos em cervídeos. Machado & Muller (1996) verificaram prevalência de 8,3% de *B. bovis* e de 29,7% de *B. bigemina* em veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) de vida livre no estado de Goiás. Já na usina hidrelétrica de Porto Primavera, no Rio Paraná foi verificada, através de testes sorológicos, uma prevalência de 88,2% de *B. bovis* e 92% de *B. bigemina* em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (Duarte 2007). Através de inoculação experimental em dois *M. gouazoubira* foi observado que *B. bovis* é mais patogênica para esses cervídeos que *B. bigemina* (Duarte 2006). Testes sorológicos e moleculares utilizando sangue de veado-campeiro mostraram alta prevalência de *Babesia* sp. nesses ruminantes no Pantanal (Villas-Boas 2007).

Uma pesquisa de *Babesia* em amostras de baço obtidas de duas espécies de cervídeos (*Capreolus capreolus* e *Cervus elaphus*) foi realizada na Eslovênia por Duh et al. (2005). Através da técnica de nested PCR, foi pesquisada a presença de *B. divergens*, parasito de bovinos e seres humanos; *B. odocoilei*, parasito de cervos-da cauda-branca nos EUA; e *Babesia* EU1, parasito de seres humanos na Europa. Foram encontradas as espécies *B. divergens* e *Babesia* EU1 em 76,5% dos *C. capreolus* e em *C. elaphus* foi encontrada apenas *B. divergens* (16,7%). Após clonagem e sequenciamento do gene 18S rRNA das amostras positivas, foi observada 99,7% de similaridade com a espécie EU1 de humanos e 99,6% de identidade entre as amostras de *B. divergens* desses cervídeos e de bovinos.

Babesia odocoilei (Emerson & Wright 1970) é uma espécie de *Babesia* encontrada nos cervos-da-cauda-branca nos EUA. O impacto verdadeiro dessa hemoparasitose não é conhecido em populações selvagens, porém, uma doença hemolítica já foi relatada em um cervo imunossuprimido (Perry et al. 1985). Waldrup et al. (1989) pesquisaram a taxa de inoculação desse hemoprotozoário em cervos-da-cauda-branca pertencentes ao Texas e Oklahoma nos EUA. A taxa de inoculação foi estimada pela prevalência sorológica e a

média de idade dos animais. Observou-se que os animais com menos de doze meses de idade tiveram menor soroprevalência positiva do que os mais velhos. Esse resultado foi atribuído ao menor tempo de exposição ao parasito que os animais jovens têm em relação aos mais velhos, ou ao menor tempo entre a exposição e a detecção de anticorpos específicos.

2.2.2.2 *Theileria*

Theileria spp. são protozoários pertencentes à classe Piroplasmida, assim como *Babesia* spp. São transmitidos por ixodídeos, não ocorrendo transmissão transovariana. Os primeiros estágios são visíveis de cinco a oito dias após a inoculação do esporozoítio pelo carrapato infectado e caracterizam-se como uma área pálida no citoplasma de linfócitos ou linfoblastos localizados nos linfonodos periféricos do hospedeiro vertebrado. Esses primeiros estágios estimulam a linfopoiese, causando uma linfadenomegalia. Corpos multinucleados (macroesquizontes contendo oito núcleos irregulares) encontram-se no citoplasma de linfócitos poucos dias após a infecção e o número de linfócitos infectados aumenta progressivamente. Os macroesquizontes são esquizontes maduros que rompem e liberam merozoítos que irão infectar outras células. Com o curso da infecção, são encontradas diferentes formas multinucleadas denominadas microesquizontes que são achadas em linfócitos e, mais frequentemente, em células reticulares ou macrófagos. Os microesquizontes maduros rompem e liberam inúmeros micromerozoítos. Estes aparecem no tecido simultaneamente ao aparecimento de corpos similares nas células vermelhas, mas não é sabido se essas formas nos eritrócitos são derivadas dos micromerozoítos, sendo que algumas formas eritrocíticas são gametócitos. Essas formas no eritrócito são denominadas de pequenos piroplasmas. As formas eritrocíticas da *Theileria* são responsáveis pela infecção do carrapato e podem também ser transmitidas por fômites e transfusão sanguínea (Kreier 1977).

No carrapato só ocorre a transmissão transtadial, sendo que a larva infectada transmite o parasito para a ninfa que não o retém após a muda para o estágio adulto. As ninfas que se alimentam em um animal infectado portam a *Theileria* no próximo estágio de adulto, mas não ocorre a transmissão transovariana. A *Theileria* só se desenvolve no carrapato após a mudança de estágio, quando são encontradas nos ácinos do tipo III da glândula salivar dos ixodídeos, provocando hipertrofia nuclear dessas células. Com a alimentação do carrapato, o parasito se desenvolve na glândula salivar, e de dois a três dias de alimentação na ninfa, e do

quarto dia de alimentação em diante nos adultos, são encontradas as formas infectantes de *Theileria* nas glândulas salivares dos carrapatos infectados (Kreier 1977).

Existem várias espécies do gênero *Theileria* que afetam os animais, que se diferem em hospedeiro preferencial, vetor, patogenicidade e distribuição geográfica (Kreier 1977). Kreier et al. (1962) foram os primeiros a relatarem o parasitismo por uma espécie de *Theileria* sp. patogênica em cervídeos nas Américas. Essa espécie de *Theileria* foi identificada morfológicamente através de análise do esfregaço sanguíneo, e uma vaca e uma ovelha não desenvolveram theileriose quando inoculado o sangue do animal doente (*Dama virginiana* = *Odocoileus virginianus*). Já um cervídeo esplenectomizado e inoculado com a mesma amostra desenvolveu uma anemia microcítica severa. Schaeffler (1962) classificou essa espécie de *Theileria* como *T. cervi* baseado em uma comparação com piroplasma obtido de *Cervus dama*.

Kuttler et al. (1967) e Barker et al. (1973) demonstraram que o carrapato *Amblyomma americanum* transmite *T. cervi* para *O. virginianus* com período pré-patente variando de 14 a 21 dias. Laird et al. (1988) estudaram a capacidade de *Amblyomma americanum* transmitir *T. cervi*. Ninfas e adultos de *A. americanum* coletados a campo através de armadilhas contendo gás carbônico foram alimentados em ovelhas por seis dias para estimular o desenvolvimento de *T. cervi* nas glândulas salivares desses carrapatos. Em seguida, os ixodídeos foram dissecados e as glândulas salivares examinadas à procura de ácidos infectados. A prevalência da infecção foi de 11%, sendo que as fêmeas foram mais parasitadas que as ninfas e nenhum macho foi encontrado contendo o parasito em sua glândula salivar. Em outra parte do estudo, foram acompanhados quatro *O. virginianus* infectados com *T. cervi*, sendo dois esplenectomizados e com infecção experimental e dois não esplenectomizados e com infecção natural. Os veados com infecção natural apresentaram parasitemia variando de 1 a 2%, e nos espécimes com infecção experimental, a parasitemia foi superior e variou entre 6 a 20%. *Amblyomma americanum* livres de infecção foram alimentados nesses animais e somente os carrapatos que se alimentaram em cervídeos com parasitemia superior a 1% se tornaram infectados com *T. cervi*. Foram infectados tanto carrapatos machos quanto fêmeas.

Geralmente infecções por *T. cervi* são consideradas assintomáticas em cervídeos. Porém, animais com alta parasitemia, debilitados, mal nutridos ou estressados podem desenvolver sinais clínicos (Kocan & Kocan 1991; Fowler 1993; Yabsley et al. 2005). Yabsley et al. (2005) acompanharam um filhote de *O. virginianus* que foi encontrado debilitado em vida

livre. O animal apresentava-se em letargia extrema e dificuldade respiratória, por isso foi sacrificado. No exame *post mortem*, o animal apresentava-se com alto índice de infestação por *A. americanum*, pronunciada icterícia, fígado friável e aumentado de volume, edema pulmonar e acúmulo de hemossiderina no fígado e baço. O exame sanguíneo revelou anemia normocítica e normocrômica e leucocitose. O esfregaço sanguíneo revelou o parasitismo por *T. cervi* em 70% dos eritrócitos. A infecção por esse piroplasma foi confirmada. Uma anemia hemolítica severa foi caracterizada pelo acúmulo de hemossiderina, a icterícia e a anemia. Não foi detectada a infecção por adenovírus e *Leptospira* spp. em testes indiretos e nenhuma bactéria patogênica em culturas.

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para estudos filogenéticos e epidemiológicos nas theilerioses animais (Inokuma et al. 2004). Chae et al. (1998) realizaram um estudo filogenético de isolados de *Theileria* sp. oriundos de bovinos e cervídeos. Foi analisada SSU rRNA (pequena subunidade ribossomal) da região V4 de diferentes isolados geográficos. Foram classificadas sete sequências de nucleotídeos padrões (Tipo A a G), sendo que as amostras de cervídeos foram do tipo F ou G e sugerem ser espécies distintas das isoladas de bovinos. Outra forma de análise filogenética de espécies de *Theileria* baseia-se na análise de sequências nucleotídicas do gene 18S rRNA.

Inokuma et al. (2004) analisaram filogeneticamente, através de PCR e análise de sequenciamento nucleotídico, as espécies de *Theileria* de *Cervus nippon centralis* e *Cervus nippon yesoensis* (“Sika deer”) no Japão. A identidade entre as espécies de *Theileria* encontradas nas duas espécies de cervídeos foi de 99%. Em relação à comparação entre espécies de *Theileria* já relatadas, a identidade foi de 97, 96 e 95% com *T. sergenti*, *T. buffeli* e *T. cervi*, respectivamente. Também foi detectado que as espécies de *Theileria* encontradas no estudo localizavam-se em um clado distinto das espécies bovinas de *Theileria*. Na Coreia do Sul, Han et al. (2009) detectaram uma prevalência de 72% de *Hydropotes inermis argyropus* (“wild Chinese Water Deer”) positivos para espécies de *Theileria*. As espécies encontradas através de análises da região 18S rRNA foram *T. ovis*, *T. capreoli* e *Theileria* sp. patogênica isolada na China.

A translocação entre animais silvestres representa risco de introdução de patógenos. Höfle et al. (2004) relataram um caso clínico de infecção por *Theileria* em um *Cervus elaphus* (“Red deer”) translocado da Alemanha para uma fazenda na Espanha. O animal apresentou sintomas de anemia hemolítica e rhabdomiólise e foi a óbito. Foram detectados 43% de

eritrócitos parasitados por estruturas sugestivas de piroplasma. A infecção por *Theileria* sp. foi confirmada através do PCR para região 18S rRNA. O estudo foi o primeiro a relatar sinais clínicos severos e morte associados à infecção por *Theileria* sp. em *C. elaphus* na Espanha.

2.2.3 Trypanosoma

As tripanosomíases são causadas por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* e infectam membros de todas as classes de vertebrados. Pertencem à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e podem ser divididos em duas sessões, de acordo com seu desenvolvimento e modo de transmissão dos vetores. A Sessão stercorária se desenvolve no intestino posterior do vetor e transmitidos pelas fezes, e a sessão salivária é transmitida pela glândula salivar do vetor (Losos 1986).

Na América do Sul, na sessão salivária, *T. vivax* e *T. evansi* são transmitidos mecanicamente por artrópodes hematófagos, transfusão sanguínea ou fômites, não ocorrendo desenvolvimento cíclico no vetor. No hospedeiro mamífero o ciclo é iniciado pela introdução de metatripanosomas pelo artrópode (Silva et al. 2002). Na América do Sul também há relatos de transmissão de *T. evansi* através da alimentação do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Hoare 1972).

Trypanosoma vivax (Ziemann 1905) é o agente etiológico da tripanosomíase bovina. Esse parasito apresenta um amplo espectro de hospedeiros, infectando um grande número de ungulados domésticos e silvestres. Surtos causados por esses parasitos em regiões não endêmicas provocam sintomatologias como alta parasitemia, aborto, anemia, queda de peso, sinais nervosos, letargia e alta mortalidade. Já em regiões endêmicas, a infecção é geralmente assintomática (Osório et al. 2008; Cuglovici et al. 2010; Galiza et al. 2011). Esse parasito diminui a produção animal, além de causar perdas econômicas pelos sinais clínicos da infecção, tais como crescimento restrito, anemia, aborto, custo do tratamento, e a morte dos animais afetados (Batista et al. 2011).

Trypanosoma evansi (Steel 1885) causa uma doença em animais domésticos e silvestres conhecida como “mal das cadeiras” ou “surra”. Em equinos, a doença é caracterizada por anemia, imunossupressão, emaciação, sintomas nervosos e morte de animais não tratados. Perdas econômicas ocorrem devido à debilidade e morte desses equinos, já que em algumas

regiões endêmicas são frequentemente usados no manejo do bovino criado extensivamente (Silva et al. 2002).

A região do Pantanal brasileiro representa uma área endêmica para esses tripanosomatídeos, por apresentar condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos vetores, além de possuir uma gama de animais domésticos e silvestres capazes de carrear esses parasitos (Franke et al. 1994; Silva et al. 2002; Davila et al. 2003; Herrera et al. 2004; Osório et al. 2008; Madruga et al. 2011).

Stuth (1977) relata a presença de três espécies de *Trypanosoma* em cervídeos (*T. vivax*, *T. evansi* e *T. mazamarum*), sendo que *T. evansi* foi considerada a espécie que causa patogenicidade nesses animais. Foram isolados tripanosomas de cervos-da-cauda-branca capturados em vários locais de Michigan, EUA. Dos animais examinados, 72% estavam infectados com tripanosoma, sendo que os animais mais velhos e os machos foram significativamente mais infectados. Morfologicamente, os tripanosomas apresentavam cinetoplasto marginal localizado anteriormente e próximo ao núcleo. A presença desse parasito foi muito frequente nesses animais, sendo que todas as amostras examinadas de cervos com idade superior a um ano encontraram-se positivas, por isso os autores sugerem que a elevada taxa de infecção em animais mais velhos pode ser um sinal de que esses cervídeos não desenvolvem uma imunidade capaz de debelar a infecção ou que proteja contra novas infecções. Entretanto, podem desenvolver uma forma de proteção imune ou têm uma resistência inata que previne infecções letais. Os tripomastigotas desse estudo mostraram-se morfometricamente similar ao *T. theileri* e morfologicamente similares ao *T. mazamarum*.

Deane (1961), em um estudo dos hemoflagelados em animais silvestres da Amazônia brasileira, observou, no sangue de um espécime de *Mazama simplicornis*, tripanosomas grandes, de núcleo submediano, cinetoplasto pequeno, redondo e muito afastado da extremidade posterior que é afilada. Também possuía membrana ondulante bem pregueada e flagelo livre e relativamente curto. Essa espécie de hemoparasito foi classificada como *Trypanosoma mazamarum*.

Trypanosoma vivax e *T. evansi* podem parasitar cervídeos na América do Sul (Soulsby 1986). Trabalhos na região do Pantanal brasileiro mostraram uma gama de animais silvestres parasitados por *T. evansi*, dentre eles alguns ungulados como catetos e queixadas (Herrera et al. 2008). Porém, a consequência do parasitismo para a saúde desses animais e seu papel

como reservatório ainda é pouco conhecido. Ungulados silvestres podem servir como reservatórios para *T. vivax*, porém nenhuma prova conclusiva foi encontrada de que os cervídeos representem um reservatório epidemiologicamente importante para a infecção por esse parasito em bovinos (Desquesnes & Gardiner 1993).

Herrera et al. (2010) avaliaram o padrão da infecção por *T. evansi* e *T. vivax* em veado-campeiro na região do Pantanal da Nhecolândia e a saúde dos animais parasitados. O diagnóstico parasitológico molecular foi realizado utilizando-se como alvo para *T. evansi* regiões satélites e para *T. vivax* o gene ribossômico. A prevalência de animais positivos para *T. evansi* foi de 68,9% (51/74), e para *T. vivax*, de 21,6% (16/74). A coinfeção foi registrada em nove animais (12,2%), e 16 veados (21,5%) estavam negativos para as duas espécies de tripanosomas. Nesse estudo, nenhum animal apresentou parasitemia patente e sexo e peso não influenciaram na presença nem na severidade das infecções. As análises hematológicas indicaram uma anemia do tipo microcítica, leucocitose por linfocitose e eosinofilia nos animais parasitados apenas por uma espécie de *Trypanosoma* e co-infectados. Os animais mostraram um padrão subclínico com baixas parasitemias, mas a anemia encontrada pode indicar que os *Trypanosoma* poderiam estar causando prejuízo à saúde dos veados. Além disso, a eosinofilia observada nos animais infectados poderia ser um indício de que a presença dos *Trypanosoma* estaria promovendo um aumento da susceptibilidade às infecções concorrentes.

Em uma infecção experimental por *T. evansi* realizada em cervo-rusa (*Cervus timorensis russa*), em Papua, Nova Guiné, foi observado o máximo de 25% de redução do volume globular no início do pico da parasitemia. Entretanto, o hematócrito se normalizou próximo ao final do experimento e não houve alterações visuais da doença. A grande persistência e os altos níveis de parasitemia indicam que esse cervídeo é um bom reservatório de *T. evansi* (Reid et al.1999).

2.2.4 Diagnóstico de hemoparasitoses através de métodos moleculares

A PCR (Reação em cadeia da Polimerase) vem sendo utilizada como ferramenta de diagnóstico de infecção por hemoparasitos por se tratar de uma técnica de alta sensibilidade (Barbet 1995; Böse et al. 1995; Figueroa & Buening 1995). Essa técnica apresenta maior sensibilidade do que métodos parasitológicos diretos, como o esfregaço sanguíneo (Desquesnes & Dávila 2002). Para aumentar ainda mais a sensibilidade do teste molecular,

pode ser utilizada uma segunda reação de PCR utilizando-se o produto da primeira reação. Essa técnica é conhecida como nested PCR (nPCR). Os iniciadores utilizados na segunda reação podem ser obtidos através da análise do sequenciamento genômico do produto obtido da primeira reação, e são internos aos iniciadores utilizados na primeira reação. A técnica de semi nested PCR utiliza um iniciador da primeira reação e outro interno, e também tem como objetivo o aumento da sensibilidade do teste.

A bioinformática é responsável pela coleta, organização e análise das sequências de DNA e proteínas, e utiliza uma série de programas com objetivos diferentes. O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) possibilita a identificação das sequências de DNA ou proteínas que possuem similaridade entre si, comparando a sequência alvo com as sequências depositadas em bancos de dados, como o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Lesk 2008). Alguns “softwares” reúnem vários programas responsáveis pela análise da qualidade das sequências e pela formação de “Contigs” (sobreposição de fragmentos de DNA derivados de uma mesma fonte genética). Um exemplo é o “Electropherogram quality analysis”, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Outros como o CLUSTALW e o MEGA (Tamura et al. 2011) podem realizar o alinhamento múltiplo de sequências de DNA, o que permite a observação da similaridade entre elas.

O sequenciamento seguido de exames pelos programas de bioinformática é ferramenta importante para análises de amostras positivas na PCR. Assim, pode-se confirmar o diagnóstico específico do produto amplificado pela PCR, através de comparações com outras sequências depositadas nos bancos de dados, além da possibilidade de estudos filogenéticos (Hillis et al. 1996).

2.2.5 Alvos para o diagnóstico molecular

O DNA ribossomal (rDNA) é composto por várias sequências repetitivas gênicas, geralmente concentradas em um cromossomo específico de um organismo. O processo evolutivo do rDNA depende dessas sequências repetitivas, o que resulta em uma grande similaridade entre as unidades que o compõe. Cada unidade repetitiva de um organismo eucarioto é composta pelos genes codificadores ribossomais 18S, 5,8S e 28S, intercalados por espaçadores, conhecidos como ITS (espaço transcrito interno) (Elder & Turner 1995).

As regiões do rDNA podem ser alvos para diagnósticos moleculares. As regiões ITS I e II não constituem regiões codificadoras, podendo variar entre espécies do mesmo gênero. No caso de tripanosomatídeos, o uso de iniciadores presentes nessa região pode originar um diagnóstico multi-espécie-específico usando uma única reação de PCR (Desquenses & Dávila 2002). Já as regiões codificadoras, como a 18S, geralmente são mais conservadas entre as espécies do mesmo gênero de organismo. Esse fato origina iniciadores que levam a resultados genéricos, e para um diagnóstico específico, é necessária a posterior realização do sequenciamento nucleotídico. O uso de iniciadores genéricos torna-se vantajoso em casos em que o pesquisador não tem a certeza do alvo específico da PCR. Como exemplo, pode-se citar as pesquisas de hemoparasitos em animais silvestres em que não se tem a certeza das espécies que parasitam esses vertebrados, e um PCR genérico oferece a oportunidade do diagnóstico de vários parasitos relacionados filogeneticamente em uma mesma reação de PCR. Zahler et al. (2000) desenvolveram um par de iniciadores a partir da região 18S com o objetivo de realizar um diagnóstico abrangente a várias espécies de protozoários Apicomplexa do gênero *Babesia* e *Theileria*.

As proteínas principais de superfície (MSPs) de micro-organismos do gênero *Anaplasma* vêm sendo alvo de numerosos estudos de diagnóstico e análise de variação antigênica e genética desses micro-organismos (de la Fuente et al. 2001a; de la Fuente et al. 2004; de la Fuente et al. 2008; Noh et al. 2010). Seis dessas proteínas foram identificadas através da análise antigênica da membrana externa de *A. marginale*, e essas proteínas estão envolvidas na interação entre as células dos hospedeiros vertebrados e invertebrados (de la Fuente 2001a).

Os genes que codificam essas proteínas evoluem mais rapidamente do que os outros, pois são submetidos às pressões seletivas exercidas pelo sistema imune dos hospedeiros. Existe uma ampla heterogeneidade genética de amostras de *A. marginale* em regiões endêmicas em todo o mundo, e introduções múltiplas dessas diferentes linhagens em regiões geográficas distintas podem ter contribuído para a diversidade genética observada nesse patógeno (Kocan et al. 2010).

A proteína MSP1a está envolvida na adesão do parasito tanto ao eritrócito bovino quanto às células do carrapato vetor (McGarey & Allred 1994; McGarey et al. 1994). Os genes *msp1a* vêm sendo utilizados em pesquisas que comparam diferentes isolados geográficos de *A. marginale*. Essas comparações são realizadas através de análises entre os pesos moleculares

e a variação entre a quantidade e a composição das repetições em tandem compostas de 23 a 31 aminoácidos (de la Fuente et al. 2001c; de la Fuente et al. 2004). Os genes da proteína MSP4 (genes *msp4*) vêm sendo utilizados em estudos filogeográficos, e esse gene demonstra variações entre os isolados (de la Fuente 2001b).

2.2.6 Uso de citometria de fluxo na avaliação da parasitemia

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para identificação e a quantificação, pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência, de células suspensas em meio líquido em fluxo. Reagentes fluorescentes específicos marcam a célula alvo que é introduzida em uma câmara de fluxo vibratória (Nakage et al. 2005). O sangue total contendo anticoagulante, ou as hemácias isoladas na camada eritrocitária após a centrifugação sanguínea, pode ser utilizado na análise dos eritrócitos por citometria de fluxo (Weiss 2002). Essa técnica vem sendo usada para a detecção de parasitemia em caso de infecção por hemoparasitos como *Plasmodium*, *Theileria*, *Babesia* e *Anaplasma* (Fukata et al. 1996; Yagi et al. 2000; Moretta et al. 2008; Jiménez-Díaz et al. 2009).

Embora o método “padrão ouro” para detecção de parasitemia ser a análise de esfregaços sanguíneos, a citometria de fluxo pode ser utilizada para detecção de baixas parasitemias. O problema de especificidade pode ocorrer principalmente pela presença de reticulocitose durante a recuperação de uma anemia responsiva (Jiménez-Díaz et al. 2009). As técnicas de citometria para detecção de DNA/RNA dos parasitos intraeritrocíticos utilizam corantes que marcam os ácidos nucleicos dos parasitos, já que os eritrócitos são anucleados (Barkan et al. 2000). O marcador Syto (SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains) é um corante que fluoresce quando se liga a ácidos nucleicos. Essa substância marca DNA e RNA de células eucariotas vivas ou mortas, assim como bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Yagi et al. (2000) utilizaram o método de citometria de fluxo com o marcador Syto 16 para avaliar a parasitemia de *Theileria sergenti* em bovinos infectados, e observaram a correlação entre a porcentagem de células positivas marcadas por Syto 16 e a parasitemia em lâmina. A população de eritrócitos parasitados foi separada completamente dos eritrócitos não parasitados, levando à conclusão de que se trata de um método eficaz para monitorar a parasitemia por *T. sergenti* no bovino. Para a avaliação da parasitemia por *A. marginale* em bovinos, Jiménez-Díaz et al. (2009) também utilizaram a citometria de fluxo usando o marcador Syto 16 em comparação com a detecção de parasitemia através de esfregaço

sanguíneo. Foi observado que a população de eritrócitos infectados era distinta da população dos eritrócitos não infectados, sendo que os eritrócitos infectados apareciam como uma segunda população celular com aumento logarítmico da intensidade da fluorescência. Este trabalho demonstra que esse método determina com precisão a parasitemia na faixa de 1-50% e permite monitorar a magnitude dos eritrócitos infectados durante a fase aguda da doença de forma objetiva e rápida. Além disso, trata-se de uma abordagem adequada para a medição de parasitemia em infecções por *A. marginale*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência dos hemoparasitos *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. e *Trypanosoma* spp. em populações de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre e de cativeiro, oriundos de Minas Gerais e de Mato Grosso do Sul, utilizando métodos parasitológicos e moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar, através de nested PCR, a ocorrência de hemoparasitos dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria* e *Trypanosoma* em três espécies de cervídeos (*M. gouazoubira*, *O. bezoarticus* e *B. dichotomus*) pertencentes aos estados de Minas Gerais e de Mato Grosso do Sul;
- Verificar por esfregaço sanguíneo a presença de hemoparasitos nesses cervídeos;
- Identificar a espécie de hemoparasito através de análise de sequenciamento nucleotídico por comparação com outras amostras descritas e depositadas no Genbank;
- Isolar e estabelecer cultivos *in vitro*, em célula IDE8, de isolados de *A. marginale* oriundos desses cervídeos;
- Inocular bezerros esplenectomizados com isolados de *A. marginale* oriundos de cervídeos a fim de verificar se eles possuem baixa virulência e se ocorre proteção quando feito o desafio com amostras de *A. marginale* já estabelecidas em cultivo *in vitro*;
- Identificar os ectoparasitos encontrados em espécimes de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre e de cativeiro, pertencentes ao estado de Minas Gerais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Ao final do item 4.1, encontra-se um organograma esquematizando a metodologia utilizada para o desenvolvimento do presente estudo (FIG. 1).

4.1 Animais estudados

4.1.1 Origem dos animais estudados

O projeto possui autorização, para ser executado, do IBAMA (número 16064-1) e do Comitê de Ética em Experimentação Animal, CETEA-UFMG (protocolo 142/08).

Foram estabelecidas parcerias para obtenção das amostras sanguíneas em animais de vida livre e de cativeiro com as seguintes entidades: EMBRAPA - Pantanal, Corumbá, MS; Centro de triagem de animais silvestres (CETAS) do IBAMA de Belo Horizonte, MG; projeto CONCERVO, pertencente ao criadouro conservacionista Fazenda Engenho-d'água (Número de licença: AO 19/2006/DIREM/NUFAS - IBAMA-MG) em Ouro Preto, MG; e Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte.

Em Minas Gerais, foram analisadas amostras de quatro cervos-do-pantanal e dois veados-catingueiros pertencentes à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte; dois veados-catingueiros pertencentes à Fazenda Engenho-d'água; e vinte e um veados-catingueiros de vida livre, recolhidos pela Polícia Florestal de Minas Gerais e encaminhados para o IBAMA de Belo Horizonte. Além disso, foram analisadas as amostras de papa de hemácias de 60 espécimes de veado-campeiro de vida livre pertencentes à região do pantanal do Mato Grosso do Sul. Os dados dos animais encontram-se no QUADRO 1.

QUADRO 1

Dados dos cervídeos estudados no período de 2006 a 2010

(Continua)

Espécie	Identificação	Sexo	Data da coleta	MG	MS	Local (MG)
<i>M. gouazoubira</i>	MGI1	Macho adulto	13/6/2007	X		Desconhecido
	MGI2	Fêmea adulta	15/6/2007	X		Brumadinho
	MGI3	Macho adulto	20/6/2007	X		Caeté
	MGI4	Fêmea adulta	26/6/2007	X		Desconhecido
	MGI5	Fêmea adulta	05 e 22/11/2007	X		Desconhecido
	MGI6	Macho adulto	8/9/2008	X		Desconhecido
	MGI7	Fêmea filhote	21/1/2009	X		Montes Claros
	MGI8	Fêmea adulta	13/4/2009	X		Contagem
	MGI9	Fêmea filhote	16/6/2009	X		Desconhecido
	MGI10	Fêmea adulta	10/6/2009	X		Desconhecido

	MGI11	Fêmea adulta	15/7/2009	X	Desconhecido
	MGI12	Fêmea adulta	17/7/2009	X	Desconhecido
	MGI13	Fêmea filhote	9/9/2009	X	Desconhecido
	MGI14	Macho filhote	3/2/2010	X	Desconhecido
	MGI15	Macho adulto	5/2/2010	X	Contagem
	MGI16	Desconhecido	9/3/2010	X	Desconhecido
	MGI17	Macho adulto	23/06/2010	X	Nova Lima
	MGI18	Fêmea filhote	28/7/2010	X	Desconhecido
	MGI19	Fêmea filhote	28/7/2010	X	Santana do Riacho
	MGI20	Macho infante	28/7/2010	X	Montes Claros
	MGI21	Macho adulto	12/08/2010	X	Desconhecido
	MGE1	Macho adulto	17/5/2008	X	Engenho-d'água/Santa Luzia
	MGE2	Macho adulto	14/6/2008	X	Engenho-d'água/Montes Claros
	MGZBH1	Fêmea adulta	30/9/2008	X	Zoo BH/Zoo Brasília
	MGZBH2	Macho adulto	7/11/2008	X	Zoo BH
Total MG	25				
<i>B. dichotomus</i>	BDZBH1	Fêmea adulta	14/7/2008	X	Zoo BH
	BDZBH2	Macho adulto	14/8/2008	X	Zoo BH
	BDZBH3	Macho adulto	23/9/2008	X	Zoo BH/Porto Primavera SP
	BDZBH4	Macho adulto	10/7/2009	X	Zoo BH/Tapiraí SP
Total BD	4				
<i>O. bezoarticus</i>	OBMS1	Fêmea filhote	25/5/2006	X	
	OBMS2	Macho filhote	25/5/2006	X	
	OBMS3	Macho adulto	29/5/2006	X	
	OBMS4	Macho adulto	31/5/2006	X	
	OBMS6	Macho filhote	29/5/2006	X	
	OBMS8	Fêmea adulta		X	
	OBMS9	Macho adulto	30/5/2006	X	
	OBMS10	Fêmea adulta	3/6/2006	X	
	OBMS11	Macho filhote	30/5/2006	X	
	OBMS12	Fêmea adulta	27/5/2006	X	
	OBMS13	Fêmea adulta	27/5/2006	X	
	OBMS14	Macho adulto	26/5/2006	X	
	OBMS15	Macho adulto	30/5/2006	X	
	OBMS16	Fêmea filhote	26/5/2006	X	
	OBMS17	Macho adulto	31/5/2006	X	
	OBMS18	Fêmea adulta		X	
	OBMS20	Fêmea adulta	31/5/2006	X	
	OBMS22	Fêmea adulta	3/6/2006	X	
	OBMS25	Macho adulto	4/6/2006	X	
	OBMS27	Macho adulto	4/6/2006	X	
	OBMS30	Macho adulto	5/6/2006	X	
	OBMS31	Fêmea adulta	21/5/2006	X	
	OBMS32	Macho filhote	21/5/2006	X	
	OBMS33	Fêmea adulta	23/5/2006	X	
	OBMS34	Fêmea filhote	20/5/2006	X	
	OBMS35	Fêmea adulta	20/5/2006	X	
	OBMS36	Fêmea adulta	20/5/2006	X	
	OBMS38	Fêmea adulta	23/5/2006	X	

OBMS39	Macho adulto	25/5/2006	X
OBMS40	Fêmea adulta	22/5/2006	X
OBMS43	Fêmea adulta	22/5/2006	X
OBMS44	Macho adulto	24/5/2006	X
OBMS45	Fêmea adulta	23/5/2006	X
OBMS46	Fêmea filhote	24/5/2006	X
OBMS47	Fêmea adulta	26/5/2006	X
OBMS48	Macho adulto	23/5/2006	X
OBMS49	Macho filhote	27/5/2006	X
OBMS50	Macho adulto	23/5/2006	X
OBMS51	Macho filhote	29/5/2006	X
OBMS52	Macho adulto	7/6/2006	X
OBMS54	Desconhecido		X
OBMS56	Macho adulto	6/6/2006	X
OBMS58	Macho adulto	6/6/2006	X
OBMS60	Desconhecido		X
OBMS61	Fêmea filhote	1/6/2006	X
OBMS62	Fêmea adulta	2/6/2006	X
OBMS63	Fêmea adulta	2/6/2006	X
OBMS64	Macho filhote	1/6/2006	X
OBMS65	Fêmea adulta	5/6/2006	X
OBMS66	Fêmea filhote	1/6/2006	X
OBMS67	Fêmea filhote	3/6/2006	X
OBMS69	Macho adulto	2/6/2006	X
OBMS70	Macho adulto	31/5/2006	X
OBMS71	Macho adulto	26/7/2006	X
OBMS72	Desconhecido		X
OBMS73	Macho filhote	27/7/2006	X
OBMS74	Macho adulto	28/7/2006	X
OBMS75	Macho adulto	28/7/2006	X
OBMS76	Macho adulto	28/7/2006	X
OBMS82			X
Total OBMS	60		

Nota: MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MGI = *Mazama gouazoubira* IBAMA; MGE = *Mazama gouazoubira* Engenho-d'água; MGZBH = *Mazama gouazoubira* zoológico; BDZBH = *Blastocerus dichotomus* zoológico; OB = *Ozotocerus bezoarticus*.

4.1.2 Coleta de amostras sanguíneas

4.1.2.1 Animais de cativeiro

Para obtenção de amostras sanguíneas de animais no zoológico, os cervídeos foram manejados de acordo com os procedimentos padrões estabelecidos pela Fundação Zoobotânica. Eles foram mantidos na manobra do recinto e, posteriormente, foi realizada a contenção química dos animais, utilizando a associação de 0,05mg/Kg de atropina, 0,5 a 1,5mg/kg de cloridato de xilazina e 5 a 10mg/Kg de quetamina, por via intramuscular através de dardos anestésicos (Nunes et al. 1997). Foram acompanhados os parâmetros de frequência respiratória e cardíaca, temperatura retal e coloração de mucosas no período anestésico. Foi

preenchido um relatório de anestesia, de acordo com Nunes et al. (1997). Após a colheita de sangue, foi administrado, por via endovenosa, 0,3 a 0,5mg/Kg de Cloridato de Ioimbina para auxiliar no retorno anestésico dos animais.

Os animais mantidos na Fazenda Engenho-d'água encontravam-se em áreas extensas e arborizadas, necessitando o uso de redes de espera para contenção física e posterior aplicação anestésica. Antes do manejo dos animais, foi realizado um planejamento operacional prévio visando selecionar o melhor local para o posicionamento da rede de espera e da equipe envolvida nesse processo. Visando minimizar o estresse de captura e contenção, os animais começaram a ser manejados por volta das oito horas da manhã. Logo depois da contenção manual, foi realizada a contenção química dos animais, utilizando a associação de cloridato de tiletamina + zolazepan (Zoletil, Virbac) na dose de 4-15mg/Kg, por via intramuscular (Nunes et al. 1997). Um exame clínico foi realizado e foram verificados os parâmetros de frequência respiratória e cardíaca, temperatura retal e coloração de mucosas no período anestésico, além do preenchimento de um relatório de anestesia, de acordo com Nunes et al. (1997). Posteriormente, administrou-se, por via intramuscular, 2mg/Kg de Flunixinina meglumina 5%, para prevenir desordens musculoesqueléticas.

Em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA), foram coletados, por punção da veia jugular, cinco mililitros de sangue de cada espécime. Para a procura de hemoparasitos no exame direto, foram realizados esfregaços de sangue periférico através de punção de ponta de cauda dos animais, e para a procura de ectoparasitos, foi realizada a inspeção do corpo dos cervídeos.

4.1.2.2 Animais de vida livre

Foi disponibilizada pela EMBRAPA, Pantanal – MS, alíquotas de papa de hemácias de 60 espécimes de veado-campeiro de vida livre, capturados por pesquisadores dessa instituição. Os animais foram capturados na Fazenda Alegria localizada no pantanal da Nhecolândia.

Quanto aos animais recolhidos pelo IBAMA, eles foram contidos quimicamente, com ou sem o auxílio de dardos anestésicos, contendo a associação de cloridato de tiletamina + zolazepan (Zoletil, Virbac) na dose de 4-15mg/Kg. Além disso, foi feito o mesmo protocolo de acompanhamento anestésico e manejo dos veados realizado na Fazenda Engenho-d'água. Nos animais vivos, também foi realizado o esfregaço de sangue periférico através da punção de ponta de cauda, punção venosa e inspeção do corpo.

4.1.2.3 Coleta de animais em exame necroscópico

Os animais de vida livre que vieram a óbito foram necropsiados e coletadas amostras de fígado, baço, rim, linfonodo e, quando possível, cérebro, para posterior extração de DNA. Além disso, foram confeccionados esfregaços por aposição dos mesmos órgãos, que foram corados com corante de Romanowsky para posterior procura de hemoparasitos.

4.1.4 Locais de realização do estudo laboratorial

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Protozoologia Veterinária e de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), na Clínica de Ruminantes e na sala de necropsia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, todos pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

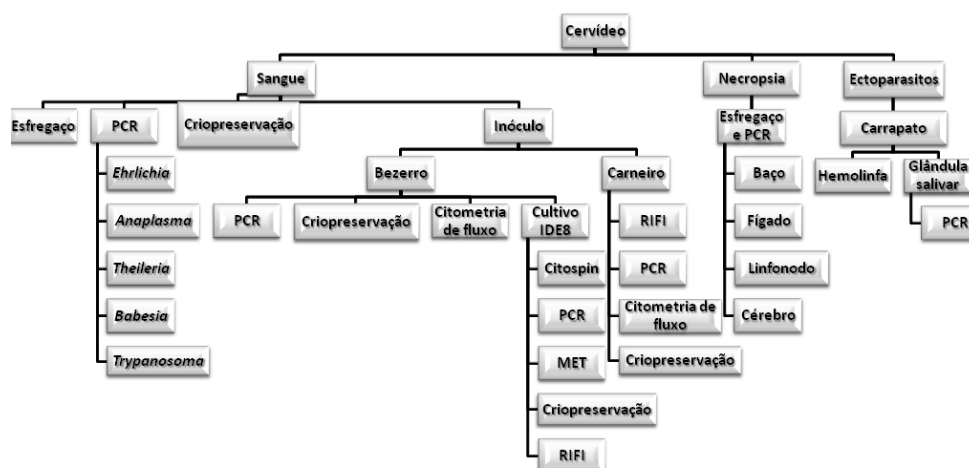


FIGURA 1: Organograma esquematizando a metodologia utilizada no presente estudo.

4.2 Processamentos das amostras

As amostras sanguíneas foram processadas da seguinte maneira:

a) Uma alíquota da amostra foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e congelados em temperatura de -20°C para futura extração de DNA.

b) Quando houve obtenção de sangue fresco, foi realizado o exame de volume globular através da técnica de microhematócrito e esfregaço sanguíneo. Os esfregaços sanguíneos foram secos ao ar livre e posteriormente corados com corante de Romanowsky (Panótico

rápido, Laborclin): a extensão hematológica foi submetida à ação de um fixador e, em seguida, a duas soluções corantes por meio de imersões de cinco segundos em cada. As lâminas foram secas ao ar e os esfregaços analisados em microscópio óptico Olympus BX40, com objetiva de imersão.

c) Amostras de sangue de seis veados-catingueiros foram congeladas em nitrogênio líquido, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO 12,5%) como crioprotetor para um futuro cultivo *in vitro* ou para obtenção de inóculos em animais experimentais. O congelamento de sangue utilizando EDTA como anticoagulante em nitrogênio líquido foi realizado de acordo com IICA (1987), com modificações:

- Centrifugar as amostras a 1200 g a 4°C por dez minutos;
- Retirar o plasma e ressuspender as células sanguíneas em PBS 1X estéril, no mesmo volume original;
- Preencher os tubos para congelamento com 0,9mL da mistura de sangue e 0,9mL da mistura de congelamento (PBS1X+DMSO 11%) e, posteriormente, armazenar em botijão contendo nitrogênio líquido.

4.3 Inoculações de sangue de cervídeos em ruminantes domésticos

Amostras sanguíneas dos cervídeos MGI5 e MGI8, positivas para *A. marginale*, detectados no esfregaço sanguíneo e no exame de nPCR, foram utilizadas como inóculo em bezerros esplenectomizados (de raça holandesa, com idade aproximada de 60 dias) e em um carneiro, respectivamente. Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG em isolamento e eram banhados semanalmente com produtos a base de piretróides para a prevenção de ectoparasitismos.

Durante o experimento, os animais foram avaliados diariamente pelo exame clínico (alterações de comportamento, coloração de mucosas, fezes, grau de desidratação, batimentos cardíacos e movimentos respiratórios por minuto).

Além da observação clínica, os animais foram avaliados por determinação do volume globular (técnica de microhematócrito) e esfregaços sanguíneos de ponta de cauda corados pelo Panótico Rápido. Após a detecção da parasitemia, amostras de sangue foram retiradas assepticamente, em tubos contendo EDTA, através de punção da veia jugular, e congeladas em nitrogênio líquido utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor.

Um carneiro adulto também foi inoculado com uma amostra sanguínea do cervídeo MGI8 e do cultivo de *A. marginale* oriundo de um dos bezerros inoculados com a amostra MGI5. O animal foi submetido às mesmas condições experimentais dos bezerros e, ao desenvolver parasitemia de 4%, amostras de sangue foram colhidas e congeladas em nitrogênio líquido nas mesmas condições descritas acima.

4.3.1 Isolamento de amostras e cultivo de *A. marginale* em células IDE8

Os tubos contendo o sangue do bezerro inoculado com o sangue do veado-catingueiro MGI5 foram submetidas ao descongelamento rápido, em banho-maria, a 37°C, centrifugadas a 10.000 g, por 20 minutos, e o sedimento ressuspense em meio de cultura L-15 contendo 10% de soro fetal bovino inativado e gentamicina. Frascos de 25cm² contendo monocamada de células IDE8 foram inoculados com a suspensão e incubados a 34 °C. Após 24 horas, o meio foi trocado e a cultura monitorada diariamente em microscópio invertido com contraste de fase. Semanalmente, realizou-se a troca do meio de cultura e o exame de esfregaço celular, obtido em centrifuga Citospin, corado pelo método de Panótico Rápido (Bastos et al. 2009). As passagens para outra garrafa contendo uma monocamada de IDE8 livres eram realizadas

quando as células apresentavam-se destruídas e a presença de corpúsculos soltos era observada. Posteriormente à estabilização da cultura em IDE8, as células infectadas foram congeladas em nitrogênio líquido utilizando DMSO 12,5% como crioprotetor.

Amostras de células IDE8 infectadas, que apresentavam características de infecção por *A. marginale* através da análise da cultura pelo microscópio óptico, foram submetidas ao estudo ultraestrutural através da microscopia eletrônica de transmissão. Foram coletados 1mL da suspensão de células IDE8 que foram centrifugadas a 2000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi fixado em solução de glutaraldeído 2% em tampão de cacodilato de sódio durante 4 horas a 4°C. As células IDE8 foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1M e incluídas em ágar nobre a 2%. Posteriormente, foram fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio a 2% em tampão de cacodilato de sódio a 4°C durante duas horas. Os blocos de ágar foram lavados com tampão cacodilato e posteriormente desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes para a inclusão em Epon-Araldite. Cortes ultrafinos (90nm) foram submetidos à dupla coloração com solução aquosa de acetato de uranila e solução de citrato de chumbo. As observações ultraestruturais foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10.

4.3.2 Citometria de fluxo para detecção de parasitemia

O marcador Syto 16 foi utilizado objetivando a marcação de ácidos nucleicos de *A. marginale*. A fluorescência foi medida através do citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton Dickinson USA).

No bezerro 1 foi realizada a citometria de fluxo no dia 65 após a inoculação, e no bezerro 2, no terceiro e décimo dias após a inoculação. No carneiro, a parasitemia foi acompanhada pela citometria de fluxo em dias alternados a partir do sétimo dia, após a inoculação de *A. marginale*. As amostras sanguíneas foram colhidas em tubos contendo heparina e processadas para análise em citômetro de fluxo, segundo Yagi et al. (2000), com algumas modificações, pelo seguinte protocolo:

- Transferir 3µl de sangue fresco colhido com heparina para um tubo de poliestireno de fundo redondo BD Falcon® (utilizar três tubos por amostra, sendo dois marcados com Syto16 e um utilizado como controle de célula);
- Adicionar 1mL de PBS1X em cada tubo;

- Adicionar 0,2µl de Syto16 na parede dos tubos marcados, não adicionando no tubo controle;
- Vortexar os tubos e incubar por 30 minutos a 37°C ao abrigo de luz;
- Lavar os tubos adicionando 2mL de PBS 1X em cada um deles, centrifugando a 600g a 18°C por dez minutos;
- Verter os tubos em papel absorvente, secando até a última gota de líquido que escorrer;
- Ressuspender com 1mL de PBS 1X para leitura, mantendo as amostras refrigeradas e ao abrigo de luz.

Posteriormente, as soluções eritrocíticas foram analisadas em citômetro de fluxo. A identificação das populações celulares de eritrócitos, bem como a determinação do valor percentual de populações marcadas com Syto16, foram realizadas em computador acoplado ao citômetro, utilizando-se o programa Cell-Quest.

4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A RIFI foi utilizada no presente estudo com dois objetivos:

- Detecção de corpúsculos de *A. marginale* no citoplasma de células IDE8 oriundas do cultivo da amostra, utilizando soros controles positivos contra esse microrganismo;

Para confecção das lâminas, foram utilizadas IDE8 infectadas com amostra oriundas de cervídeo. Anteriormente, as amostras foram analisadas em esfregaços celulares e foram utilizadas passagens que continham, em sua maioria, células inteiras, núcleo periférico, e com vacúolos contendo materiais sugestivos a corpúsculos de *A. marginale*. Foi seguido o protocolo segundo Aguiar et al. (2007).

- Detecção de anticorpos anti-*A. marginale* nos dois bezerros e no carneiro, inoculados experimentalmente com a amostra oriunda de cervídeo. Foram utilizadas lâminas de esfregaço sanguíneo bovino espesso contendo hemácias parasitadas por esse microrganismo, confeccionadas segundo IICA (1987).

Para ambos os casos, os soros foram diluídos em PBS 1X na proporção de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:640. Foram colocados 10µL de soro teste em cada poço da lâmina, inclusive o controle positivo e o branco (PBS 1X). Após a incubação de 37°C, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 3 minutos e uma vez com água destilada, também por três minutos, e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado, em cada poço, o conjugado antiovíno ou antibovino, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fiocruz/Biomanguinhos) diluído a 1: 100 em azul de Evans (1:50 em PBS Tween). As lâminas foram incubadas novamente a 37°C por 30 minutos e lavadas do mesmo modo descrito acima. Então, foram secas em temperatura ambiente, foi adicionada glicerina tamponada e, em seguida, cobertas por lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluoresceína, em aumento de 20X e 40X.

4.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

4.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante para extração de DNA de 300µl de sangue, e através de modificações para extração de papa de hemácias. No caso das papas de hemácias, antes de começar o protocolo descrito pelo fabricante, a amostra foi incubada a 37°C com 15µl de saponina a 5% por 10 minutos e o precipitado lavado aproximadamente sete vezes com PBS 1X estéril (10.000rpm/3 minutos).

A extração de DNA das amostras de tecidos foi realizada usando o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante para extração de DNA de tecido (fígado e cérebro de camundongo). Para a extração de DNA das glândulas salivares dos carrapatos, foi utilizado o mesmo kit com algumas adaptações:

- Antes da dissecação da glândula salivar, o carrapato foi pesado em balança de precisão e o peso da glândula salivar foi considerado 10% do peso do carrapato;
- As glândulas salivares dissecadas foram separadas agrupadas por sexo em adultos ou estágio de desenvolvimento do carrapato, quando ninfa;
- A quantidade de cada reagente do kit foi calculada proporcionalmente considerando o peso do “pool” de glândula salivar.

Algumas amostras de sangue e todas as amostras de glândula salivar foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop para testar a qualidade da extração e a quantidade de DNA por amostra.

4.6.2. Amplificação do DNA por nested ou semi-nested PCR

Para amplificação do DNA dos parasitos dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria* e *Trypanosoma evansi*, foram realizadas reações de nested ou semi-nested PCR visando aumentar a sensibilidade do teste. Para *T. vivax* foi utilizado o PCR convencional (Bezerra et al. 2008), já que não obtivemos sucesso com os primers desenhados para semi-nested PCR (Tvivax1F: TCCGACCCTCTTCTCTTCTC; Tvivax1R: TGCCCTGCGTGTGTGTGTGT; Tvivax2R: GGCGTGTGTTGTGTTCGAC).

Para a primeira reação, foram utilizados iniciadores obtidos na literatura ou desenhados pelo nosso grupo de pesquisa, através do alinhamento de sequências do parasito alvo depositadas no GenBank, e uso do programa OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageID=9716>). Para a segunda reação, foram utilizados iniciadores internos aos da primeira reação, obtidos da mesma maneira que os iniciadores da primeira reação. As sequências utilizadas estão especificadas na TAB.2.

4.6.2.1 Amplificação do DNA

O termociclador automático (Eppendorf Mastercycler®) foi utilizado para amplificar o DNA extraído. Os iniciadores utilizados em cada reação encontram-se especificados no QUADRO 2, assim como os produtos de cada reação (QUADRO 2) e os programas utilizados (QUADROS 3 a 6).

Os produtos obtidos da segunda reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE (0,5 X). Para isso, foram aplicados 5µl do produto da amplificação e 1µl de tampão da amostra 6X por canaleta do gel. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 1Kb Ladder Plus (Fermentas). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 volts, por aproximadamente 40 minutos, corado com uma solução de brometo de etídio por 15 minutos, ou por gel red (Biotium) (1µl/ 10µl de TAE 0,5X), e observado sob lâmpada UV.

QUADRO 2

Sequência de iniciadores que foram utilizados para identificação dos gêneros de hemoparasitos

Gênero	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
<i>Babesia/Theileria</i> 1º reação	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC	RIB-19	18S	1700	Zahler et al. 2000
	CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-20	rRNA		
2º reação	ACCTCACCAGGTCCAGACAG	BAB-rumF	18S	430	Silveira et al. 2011
<i>A. marginale/A. ovis</i> 1º reação	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumR	rRNA		
2º reação	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC	MSP45	<i>msp4</i>	872	de la Fuente et al. 2008
1º reação	CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC	MSP43			
2º reação	CGCCAGCAAACTTTTCCAAA	AnapF	<i>msp4</i>	294	Silveira et al. <i>In press</i>
<i>A. marginale</i> 1º reação	ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapR			
2º reação	GCTTTACGCCGCCGCTGCGCC	MSP1aP	<i>msp1a</i>	2000	Fuente et al. 2001b
1º reação	GCATTACAACGCAACCGTTGA	MSP1a3			
2º reação	TGTGGTTGTCCTCTTTCCCGATGT	MSP1aNF	<i>msp1a</i>	800	Bastos et al. 2009
<i>Ehrlichia spp. monocítica</i> 1º reação	CACCGCCAAACATGAAGTCGACAA	MSP1aNR			
2º reação	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	NS16SCH1F	16S	1195	Kawahara et al. 2009
1º reação	ACAACCTTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1R	rRNA		
2º reação	GGGCACGTAGGTGGACTAG	NS16SCH2F	16S	443	Kawahara et al. 2009
<i>Ehrlichia spp. granulocítica</i> 1º reação	CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2R	rRNA		
2º reação	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	GE3a	16S	932	Massung et al. 1998
1º reação	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE10r	rRNA		
2º reação	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT	GE9f	16S	546	Massung et al. 1998
<i>T. evansi</i> 1º reação	GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	GE2	rRNA		
2º reação	GCACAGTATGCAACCAAAAA	Te1F	ITS	280	*
1º reação	GTGGTCAACAGGGAGAAAAT	Te1R	ITS	219	*
2º reação	CATGTATGTGTTTCTATATG	Te2F			
<i>T. vivax</i>	GCCATCGCCAAGTACCTCGCGA	Tvi2	Domínio catalítico gene da Catepsi-na L	177	Bezerra et al. 2008
	TTAGAATTCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA	DT0156			

Nota: O símbolo * corresponde aos iniciadores desenhados pelo nosso grupo de pesquisa

QUADRO 3

Condição para reação de nested PCR para *Babesia* spp./*Theileria* spp., *A. marginale*/*A. ovis*, *Ehrlichia* spp. monocítica, *Trypanosoma vivax* e *T. evansi*, usando os primers RIB19/20, MSP45/3, NS16SCH1F/R, Tvi2/DTO156, Te1F/R (primeira reação) e BabRumF/R, AnapF/R, NS16SCH2F/R e Te2F/1R (segunda reação), respectivamente

Reagente	Volume (µl): 1ª reação	Volume (µl): 2ª reação
H ₂ O MiliQ	10,05	16,75
Tampão IB (1X)	1,5	2,5
dNTP (10mM)	1,2	2,0
Mix primer (F+R) (10mM)	0,6	1,0
Taq polimerase (5U/µL)	0,15	0,25
DNA/produto 1ª reação	1,5	2,5
Volume final	15	25

QUADRO 4

Condição para reação de nested PCR para *A. marginale* (Am) e *Ehrlichia* granulocítica (EG) usando os primers MSP1aP/3, Ge3a/10r (primeira reação) e MSP1aNf/R e Ge2/9f (segunda reação).

Reagente	Volume (µl): 1ª reação (Am)	Volume (µl): 2ª reação (Am)	Volume (µl): 1ª reação (EG)	Volume (µl): 2ª reação (EG)
H ₂ O MiliQ	9,42	15,7	9,9	16,5
Tampão IB (1X)	1,5	2,5	1,5	2,5
dNTP (10mM)	1,2	2,0	1,2	2,0
Mix primer (F+R) (10mM)	1,2	2,0	0,75	1,25
Taq polimerase (5U/µL)	0,18	0,3	0,15	0,25
DNA/produto 1ª reação	1,5	2,5	1,5	2,5
Volume final	15	25	15	25

QUADRO 5

Programas submetidos ao termociclador automático para realização do nested PCR para amplificação para *Babesia* spp./*Theileria* spp., *A. marginale*/*A. ovis*, *Ehrlichia* spp. monocítica, *Trypanosoma vivax* e *T. evansi* usando os primers RIB19/20, MSP45/3, NS16SCH1F/R, Tvi/DTO156 e Te1F/R (primeira reação) e BabRumF/R, AnapF/R, NS16SCH2F/R e Te2F/1R (segunda reação)

Ciclo	Passo	Temperatura (°C)	Duração
1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min
2 (29x)	Desnaturação	92	1 min
	Anelamento	54	1 min
	Extensão	72	2 min
3 (1x)	Extensão final	72	8 min
4	“Hold”	12	

QUADRO 6

Programas usados para realização do nested PCR para amplificação de *A. marginale* (Am) e *Ehrlichia* granulocítica (EG) usando os primers MSP1aP/3, Ge3a/10r (primeira reação) e MSP1aNF/R e Ge2/9f (segunda reação)

Ciclo (Am)	Passo	Temperatura (°C)	Duração	Ciclo (EG)	Passo	Temperatura (°C)	Duração
1ª reação				1ª reação			
1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min	1 (1x)	Desnaturação inicial	95	2 min
2 (29x)	Desnaturação	94	30 seg	2 (40x)	Desnaturação	94	30 seg
	Anelamento	64	30 seg		Anelamento	55	30 seg
	Extensão	68	2 min e 30 seg		Extensão	72	1 min
3 (1x)	Extensão final	68	5 min	3 (1x)	Extensão final	72	5 min
4	“Hold”	18		4	“Hold”	12	
2ª reação				2ª reação			
1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min	1 (1x)	Desnaturação inicial	95	2 min
2 (35x)	Desnaturação	94	30 seg	2 (30x)	Desnaturação	94	30 seg
	Anelamento	60	1 min		Anelamento	55	30 seg
	Extensão	72	30 seg		Extensão	72	1 min
3 (1x)	Extensão final	72	5 min	3 (1x)	Extensão final	72	5 min
4	“Hold”	18		4	“Hold”	12	

4.7 Sequenciamento nucleotídico de *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria* e *Trypanosoma*

As amostras positivas, após a segunda reação de PCR, foram purificadas pelo QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante, ou através de Polietilenoglicol (PEG) (www.icb.ufmg.br/lbem). Posteriormente, cada amostra purificada foi submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed, para confirmação da purificação das amostras.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando *DYEnamicTM dye terminator kit MegaBACETM* (Amershan Biosciences), sendo que para cada amostra, foram utilizados:

- 4µL de ET kit;
- 1µL de primer da segunda reação (“Forward” ou “Reverse” (5µm));

- 2µL ou 4µL do produto de PCR (dependendo da concentração analisada em gel de agarose);
- Água de miliQ q.s.p 10µL.

As reações foram processadas em termociclador automático (Eppendorf Mastercycler®) em 30 ciclos, sendo: 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e manutenção das amostras a 4°C.

Essa etapa foi seguida da precipitação de nucleotídeos não incorporados segundo o protocolo do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular-LBEM do ICB da UFMG em placa 96 well (www.icb.ufmg.br/lbem):

Para 10 µL de reação de sequenciamento:

- Adicionar 1µL de acetato de amônio (7,5M ET Kit);
- Adicionar 2,5 volumes de etanol absoluto: 28 µL (100-95%);
- Vortexar vigorosamente;
- Colocar selante e incubar 15 minutos a temperatura ambiente (enrolar em alumínio devido à presença de nucleotídeos marcados);
- Centrifugar 45 min a 2057 g, temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante, por inversão da placa (inverter de uma vez e manter a placa invertida para escorrer o álcool);
- Adicionar 150 µL de etanol 70%;
- Centrifugar 15 min a 2057 g, temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante, por inversão da placa, e manter a placa invertida;
- “Spin down” com a placa invertida a 463 g, 1 minuto;
- Adicionar 10µL de “loading buffer” (70% de formamida, 1mM EDTA);
- Vortexar vigorosamente, para dissolver o precipitado de DNA, e dar um spin;

- Manter a placa refrigerada a -20°C.

As amostras foram, então, submetidas à leitura, no sequenciador automático capilar *MegaBace 1000™ sequencing system* (Injeção no MegaBACE: 2KV, 60 segundos; Corrida no Mega BACE: 6KV, 200 minutos).

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata e cada um dos amplicons foi sequenciado duas vezes, sendo uma vez com o iniciador direto, e uma com o reverso, totalizando quatro sequências/amostra, o que permitiu uma maior confiabilidade das sequências consenso que foram obtidas.

As sequências consenso para cada amostra resultaram do alinhamento das quatro sequências, com o auxílio dos programas do site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> e MEGA 4.0 e MEGA 5.0 software. (Tamura et al. 2011).

4.7.1 Análise das sequências em bancos de dados

As sequências obtidas do sequenciador *MegaBACE™ 1000* foram analisadas quanto à qualidade, e os “Contigs” foram formados com o auxílio do programa “Electropherogram quality analysis”, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Em seguida, as sequências foram submetidas à procura de homologia com as sequências depositadas em banco de dados. Para isso, foi utilizado o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTN para nucleotídeos e BLASTX para proteínas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Após a comparação no BLAST, as sequências analisadas eram caracterizadas em espécie, de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no Genbank.

4.8 Estudo da transmissão dos hemoparasitos pelos carrapatos

Em alguns cervídeos capturados em Minas Gerais, foi possível a coleta de espécimes de carrapatos. Nesses ixodídeos, foi realizado o estudo da hemolinfa ou da glândula salivar, com o objetivo de detectar hemoparasitos que poderiam ser transmitidos por eles.

Para a detecção de esporocinetos de *Babesia/Theileria* na hemolinfa ou da presença de corpúsculos nos hemócitos, sugestivos da Família Anaplasmataceae, os carrapatos coletados dos cervídeos foram acondicionados em recipientes individuais devidamente identificados, e

incubados em estufa B.O.D. em temperatura média de 28°C e U.R. de 80%. Após um período de sete dias, foi realizada a coleta de hemolinfa através do corte da extremidade anterior (tarso/metatarso) do primeiro par de patas do carrapato. A hemolinfa foi transferida para lâminas, secas ao ar e coradas com Panótico e, posteriormente, analisada em microscópio óptico.

Para o estudo da transmissão de hemoparasitos pelos carrapatos, é necessária a procura do parasito na glândula salivar do possível carrapato transmissor. Quando os carrapatos analisados eram colhidos já no estágio adulto, dois procedimentos foram realizados, dependendo da biologia do carrapato:

- Carrapatos monoxênicos: os espécimes foram incubados em estufa B.O.D., em temperatura média de 28°C e U.R. de 80% por no mínimo quinze dias para a completa digestão do sangue do cervídeo contido em seu intestino. Após esse período, os carrapatos foram dissecados e as glândulas salivares separadas e colocadas em “pool”, em recipientes separados, de acordo com o sexo;
- Carrapatos trioxênicos: os adultos não ingurgitados foram colocados para alimentar em outro hospedeiro, como camundongo, por no mínimo quatro dias para estimular o desenvolvimento do parasito na glândula salivar. Posteriormente, foram processados da mesma maneira que os carrapatos monoxênicos.

Quando foram colhidas ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*, os espécimes foram processados da seguinte maneira:

- Ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* coletadas dos cervídeos foram acondicionadas em recipientes individuais devidamente identificados e incubados em estufa B.O.D. em temperatura média de 26°C e U.R. de 80% para realização da ecdise. Após a ecdise para o estágio adulto, os espécimes foram mantidos na estufa por 50 dias e, posteriormente, colocados para alimentar em outro hospedeiro por três dias para estimular o desenvolvimento do parasito na glândula salivar. Em seguida, eram processadas similarmente aos outros carrapatos.

As glândulas salivares dissecadas, caso houvesse quantidade suficiente, foram divididas em duas alíquotas, sendo uma submetida à pesquisa de parasitos através de nPCR e outra corada pelo verde metil-pironina (Walker et al. 1979).

4.9 Metodologia de apresentação dos resultados

Os resultados foram apresentados sob a forma de dois artigos científicos (um já publicado e outro *in press*). Outros resultados que não constam nos artigos foram também apresentados, além de um tópico de considerações gerais.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados dos animais oriundos de Minas Gerais

5.1.1 Ordem Piroplasmida (*Babesia* spp. e *Theileria* spp.)

5.1.1.1

Veterinary Parasitology 177 (2011) 61–66

Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil

Júlia A.G. da Silveira, Élide M.L. Rabelo, Múcio F.B. Ribeiro*

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

article info

Article history:

Received 13 April 2010

Received in revised form 19 October 2010

Accepted 25 October 2010

Keywords:

Cervids

Hemoprotozoa

Theileria spp.

Theileria cervi

Babesia bovis

Babesia bigemina

abstract

Intraerythrocytic protozoan species of the genera *Theileria* and *Babesia* are known to infect both wild and domestic animals, and both are transmitted by hard-ticks of the family Ixodidae. The prevalences of hemoprotozoa and ectoparasites in 15 free-living *Mazama gouazoubira*, two captive *M. gouazoubira* and four captive *Blastocercus dichotomus* from the State of Minas Gerais, Brazil, have been determined through the examination of blood smears and the use of nested polymerase chain reaction (nPCR). The cervid population was inspected for the presence of ticks and any specimens encountered were identified alive under the stereomicroscope. Blood samples were collected from all 21 animals, following which blood smears were prepared, subjected to quick Romanowsky staining and examined under the optical microscope. DNA was extracted with the aid of commercial kits from cervid blood samples and from tick salivary glands. The nPCR assay comprised two amplification reactions: the first was conducted using primers specific for a 1700 bp segment of the 18S rRNA gene of *Babesia* and *Theileria* species, whilst the second employed primers designed to amplify a common 420 bp *Babesia* 18S rRNA fragment identified by aligning sequences from *Babesia* spp. available at GenBank. The ticks *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* were identified in various of the cervids examined. Of the animals investigated, 71.4% (15/21) were infected with hemoprotozoa, including *Theileria cervi* (47.6%), *Theileria* sp. (14.3%), *Babesia bovis* (4.8%) and *Babesia bigemina* (4.8%). However, only one of the infected wild cervids exhibited accentuated anaemia (PCV = 17%). This is first report concerning the occurrence of *Theileria* spp. in Brazilian cervids.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The identification of infectious agents in wild animals is not only crucial for the preservation of species but also provides valuable information regarding the epidemiological chain of diseases. This is particularly important with regard to members of the Cervidae, for example, whose natural habitat has been transformed significantly

as a result of intense deforestation driven by the needs of farmers and cattle breeders. One consequence of such changes is that many cervids have started living in close proximity with domestic ruminants, hence favouring the interchange of infectious microorganisms between the populations. Additionally, knowledge relating to infectious microorganisms is important for cervids maintained in captivity, since it has significant application in animal management, particularly with respect to the transit of animals between zoos and breeding stations and the inadvertent introduction of exotic pathogens into such locations.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34092842; fax: +55 31 34092970.

E-mail address: mucioibr@icb.ufmg.br (M.F.B. Ribeiro).

Intraerythrocytic protozoan species of the genera *Theileria* and *Babesia* are known to infect both wild and domestic animals, and both are transmitted by hard-ticks of the family Ixodidae (Ristic and Kreier, 1981). Species of *Theileria* are cosmopolitan parasites (Chae et al. 1999) that have been detected in wild ruminants in Japan (Inokuma et al. 2004), Germany (Höfle et al. 2004) and South Korea (Han et al. 2009). In the United States, the occurrence of *Theileria cervi* has been reported in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) (Kocan and Kocan, 1991), elk (*Cervus canadensis*), mule deer (*Odocoileus hemionus*), Axis deer (*Axis axis*) and sika deer (*Cervus nippon*), with the distribution of the parasite being associated with the geographic distribution of the vector, namely, the tick *Amblyomma americanum* (Laird et al. 1988; Waldrup et al. 1989; Kocan and Kocan, 1991). Infection with *T. cervi* is considered benign, although some clinical symptoms have been observed in cervids that have been weakened by other parasites, or are undernourished or stressed (Kocan and Kocan, 1991; Fowler, 1993; Yasbly et al. 2005). There are, however, no reports of the presence of *Theileria* spp. in South American cervids.

The hemoparasites *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) and *B. bovis* (Babes, 1888) have been detected by indirect immunofluorescence (IFAT) and nested polymerase chain reaction (nPCR) assays in free white-tailed deer in northern Mexico (Cantu et al. 2007). The presence of anti-*Babesia* *odocoilei* antibodies has also been described in this cervid (Waldrup et al. 1989, 1992). Although the actual impact of such parasite on wild populations is not known, the occurrence of clinical manifestations has been reported in an immunosuppressed cervid (Perry et al. 1985).

Investigations of the infection of cervids by hemoparasites in Brazil are somewhat scarce. However, a high prevalence of *Babesia* spp. was reported in pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) from the Brazilian Pantanal (Villas-Boas et al. 2009). Additionally, Machado and Müller (1996) reported that the frequencies of *B. bovis* and *B. bigemina* in pampas deer from the State of Goiás were, respectively, 8.3 and 29.7%. According to serological tests, however, the prevalences of these two parasites in marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) from the Porto Primavera Hydroelectric Power Station located in Paraná River (State of Paraná, Brazil) were considerably higher, at 88.2 and 92%, respectively (Duarte, 2007). Experimental inoculation of the grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*; also known as brown brocket deer or bush deer) with *B. bovis* or *B. bigemina* revealed that the former parasite is more pathogenic than the latter (Duarte, 2006). Interestingly, antibodies against *B. bovis*, *B. bigemina* or *B. odocoilei* were not present in wild specimens of *M. gouazoubira* from the Gran Chaco in Bolivia (Deem et al. 2004).

In contrast to the above, the occurrence of ectoparasites in Brazilian cervids has been widely reported. Ticks of the species *Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma mantiqueirensis*, *Haemaphysalis kohlsi*, *Ixodes luciae* and *Ixodes aragoi* have been variously found in the cervids *M. gouazoubira*, *B. dichotomus* and *O. bezoarticus* (Aragão and Fonseca, 1961; Serra-Freire

and Teixeira, 1993; Szabó et al. 2003; Duarte, 1997; Cançado et al. 2009).

The aim of the present study was to evaluate the occurrences of intraerythrocytic protozoa and ticks in free-living and captive specimens of the cervids *M. gouazoubira* and *B. dichotomus* from the State of Minas Gerais, through the analysis of blood smears and by nPCR assay.

2. Materials and methods

The study, which was carried out during the period June 2007 and September 2009, was approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (CETEA/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) under protocol no. 142/08, and by the Brazilian Institute for Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA, Belo Horizonte, MG, Brazil) under licence no. 16064-1.

2.1. Animal population

The animal population (Table 1) comprised free-living specimens of *M. gouazoubira* (n = 15) and captive specimens of *M. gouazoubira* (n = 2) and *B. dichotomus* (n = 4). The free-living animals had recently been captured by the Forestry Police and conveyed either to IBAMA (n = 13) or to the conservation station Fazenda Engenho d'Água (Ouro Preto, MG, Brazil; n = 2). The captive animals, some of which had been born in captivity and others captured from the wild, had been maintained for a number of years in the Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte.

2.2. Blood sampling

Blood from all 21 animals was collected by puncture of the jugular vein and samples were transferred immediately to vials containing EDTA. In the case of free-living *M. gouazoubira*, sampling was performed within two days of their original capture from the wild. Blood smears were prepared, subjected to quick Romanowsky staining (Panótico Rápido; Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and examined under the optical microscope at 100× magnification. For each sample, at least 40 microscopic fields were observed. Packed cell volume (PCV) was determined using the microhematocrit method (Jain, 1993). Further aliquots of blood samples were frozen and stored for subsequent DNA extraction.

2.3. Tick collection

Animals were inspected for the presence of ticks and all specimens collected were examined alive under an Olympus (Tokyo, Japan) stereomicroscope model SZ40 and identified according to the criteria of Aragão and Fonseca (1961). Ticks were placed in a biochemical oxygen demand (BOD) chamber and maintained at 26 °C and 80% relative humidity until moulting occurred. After moulting, ticks remained in the chamber for 50 days, after which they were transferred to a rubber (ethylene vinyl acetate) chamber, which was sealed with cotton fabric fixed in place by universal contact adhesive (Brascoplast; Brascola, São Bernardo do Campo, SP, Brazil), and allowed to feed on a calf

Table 1
Characterization of the cervids examined, namely, Mazama gouazoubira and Blastocerus dichotomus, with respect to sex/age, origin, sampling date, blood smears results, molecular sequencing results (*Theileria* sp., *T. cervi*, *Babesia bovis* and *B. bigemina*) and infestation by ticks (*Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor nitens* and *Amblyomacajemense*).

Cervids	Identification	Sex/age	Date	Blood smear	<i>Theileria</i> sp.	<i>T. cervi</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>R. microplus</i>	<i>D. nitens</i>	<i>A. cajemense</i>
Mazama gouazoubira	MG11	Adult male	13/6/2007		X						
	MG12	Adult female	15/6/2007			X			X		X
	MG13	Adult male	20/6/2007			X			X		X
	MG14	Adult female	26/6/2007								
	MG15	Adult female	5/11/2007	X		X					
	MG16	Adult female	8/9/2008			X					
	MG17	Fawn female	21/1/2009								
	MG18	Adult female	13/4/2009	X		X				X	
	MG19	Fawn female	16/6/2009		X				X	X	
	MG110	Adult female	10/6/2009								
	MG111	Adult female	15/7/2009	X		X			X	X	X
	MG112	Adult female	17/7/2009	X		X			X	X	X
	MG113	Fawn female	9/9/2009								
Blastocerus dichotomus	MGE1	Adult male	17/5/2008	X		X				X	
	MGE2	Adult male	14/6/2008	X				X			
	MGZBH1	Adult female	30/9/2008			X					
	MGZBH2	Adult male	7/11/2008								
	BDZBH1	Adult female	14/7/2008								
	BDZBH2	Adult male	14/8/2008								
	BDZBH3	Adult male	23/9/2008			X					
RDZPH4	Adult male	10/7/2009								X	

for three days. Nymphs and adults were dissected, the salivary glands collected and immersed in a cell lysis solution for subsequent DNA extraction.

2.4. DNA extraction and PCR amplification

DNA was extracted from cervid blood samples (300 µL) with the aid of a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) employed according to the manufacturer's instructions. In order to extract DNA from tick salivary glands, the same commercial kit was used following the manufacturer's instructions designated for the extraction of DNA from tissue cultures.

The nPCR assay of genomic DNA involved two separate amplification reactions. The first reaction was carried out using the primers RIB-19 (5 CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC3) and RIB-20 (5 CCGAATTCCTTGTACGACTTCTC3) that are specific for a 1700 bp segment of the 18S rRNA gene from *Babesia* and *Theileria* spp. (Zahler et al. 2000). The reaction mixture comprised 1.2 µL of dNTPs (0.2 mM), 0.15 µL of Taq polymerase (0.05 U), 1.5 µL which buffer (1x), 0.6 µL of a solution containing the mixed primers (10 mM) and sufficient sterile ultra-pure water to give a final volume of 15 µL. A 1.5 µL aliquot of the DNA template was added to the reaction mixture, and amplification was performed using an Eppendorf (São Paulo, SP, Brazil) Mastercycler® thermocycler programmed as follows: 94 °C for 5 min (initial denaturation step), 30 cycles each comprising 92 °C for 1 min (denaturation), 54 °C for 1 min (annealing) and 72 °C for 2 min (extension), and a final extension step at 72 °C for 8 min. Following amplification, reaction mixtures were maintained at 12 °C. PCR amplicons were separated by electrophoresis on 1% agarose gel (40 min, 100 V), stained with ethidium bromide and visualised under ultraviolet light.

The second reaction was carried out using primers BabRumF (5 ACCTCACCAGGTCCAGACAG3) and BabRumR (5 GTACAAAGGGCAGGGACGTA3) that were designed to amplify a common 420 bp *Babesia* 18S rRNA fragment identified by aligning sequences from *Babesia* spp. available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), namely, *B. bigemina* (X59607), *B. odocoilei* (U16369), *Babesia divergens* (U07885) and *B. bovis* (L31922). The reaction mixture comprised 2.0 µL of dNTPs (0.2 mM), 0.25 µL of Taq polymerase (0.05 U), 2.5 µL which buffer (1x), 1.0 µL of a solution containing the mixed primers (10 mM) and sufficient sterile ultra-pure water to give a final volume of 25 µL. An aliquot (2.5 µL) of amplicon obtained in the first reaction were added to the reaction mixture and amplification was carried out under the conditions described above. Products were separated by electrophoresis and visualised as described above, and subsequently purified with the aid of QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, SP, Brazil) used according to the recommendations of the manufacturer. Sequencing of the purified amplicons was performed on a MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Health-care, Waukesha, WI, USA) using the BabRum primers. Sequences were aligned, edited and analysed at the URL <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> using MEGA

4.0 software. The identity of each sequence was confirmed by comparison with other sequences available at GenBank using BLAST software.

3. Results

Blood smears and PCV could be evaluated for just 12 blood samples (nine *M. gouazoubira* and three *B. dichotomus*) since the remaining nine presented haemolysis during storage in the fridge. Seven out of the 12 blood smears (58.3%) presented erythrocytes infected with protozoa in the form of small trophozoites (<2 μ m). The positives blood smears were the free-living *M. gouazoubira*.

However, the infected animals presented low parasitemia, which varied in the range 0.0125–0.200%. The mean PCV value for *M. gouazoubira* was 30.6% (interval 17–50%), whilst the mean value for *B. dichotomus* was 27%.

According to the nPCR assays, 15 (71.4%) of the 21 blood samples (13 from *M. gouazoubira* and two from *B. dichotomus*) were infected with hemoprotozoa. BLAST analysis of the amplicon sequences showed that the protozoan DNA extracted from one *B. dichotomus* and nine *M. gouazoubira* samples presented high similarity with *T. cervi* DNA (AY735135.1), namely, MGI12 (accession number HM466922) (99%), MGI2 (accession number HM466923), MGI5 (accession number HM466928), MGI6 (accession number HM466929), MGE1 (accession number HM466930), MGZBH1 (accession number HM466926) and BDZBH3 (accession number HM466927) (98%), MGI3 (accession number HM466923) (97%), MGI8 (accession number HM466925) (96%) and MGI11 (accession number HM466920) (91%). Amplicon sequences from a further three *M. gouazoubira* samples, namely, MGI1, MGI13 and MGI9 (accession number HM466921), exhibited 97 to 98% similarity with *Theileria* sp. (FJ668374.1), whilst that from *M. gouazoubira* sample MGE2 (accession number HM466918) presented 99% similarity with *B. bigemina* (EF458206.1). The amplicon sequence from *B. dichotomus* sample BDZBH4 (accession number HM466919) exhibited 96% similarity with *Babesia bovis* (EF458215.1).

Nested PCR assays of the pools of tick salivary glands showed negative although the control was positive.

Although the nested PCR primers had been designed based on *Babesia* sequences, the sequencing from the amplified products showed that all these sequences share some homology, and by the blast search it was shown, undoubtedly, that these sequences came from different organisms. Actually, these results were serendipity founds, as we were searching for *Babesia* species. After the products had been identified as *Theileira*, the sequences between *Babesia* and *Theileiria* were aligned, showing that they present homology to the primers region.

There was general concordance between the results of the nPCR assays and those of blood smears, in that the nPCR-positive samples MGI5, MGI8, MGI11, MGI12, MGE1 and MGE2 were also positive for the presence of hemoprotozoa in the blood smears. In the case of the adult female *M. gouazoubira* MGI11, for example, the blood smear revealed the presence of trophozoites and the animal also exhibited accentuated anaemia (PCV = 17%). As expected, the nPCR negative samples MGI7, MGZBH2, BDZBH1 and BDZBH2

were also negative for the presence of trophozoites in the blood smear.

Regarding the occurrence of ectoparasites, the majority of the free-living animals were infested with ticks of the species *R. microplus* (5/15; samples MGI2, MGI3, MGI9, MGI11, MGI12), *D. nitens* (5/15; samples MGI8, MGI9, MGI11, MGI12, MGE1) and *A. cajennense* (4/15; samples MGI2, MGI3, MGI11, MGI12). Indeed, from one free-living *M. gouazoubira* presenting intraerythrocytic trophozoites in the blood smear, a total of seven larvae and three engorged nymphs of *Amblyomma* sp. were collected. In contrast, the captive animals maintained at the Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte were tick-free.

4. Discussion

Although various species of *Theileria* are known to infect domestic and wild animals, *Theileria (Babesia) equi* is the only hemoparasite of this description to have been reported in Brazil so far. Moreover, whilst the occurrence of *T. cervi* in North American cervids has been widely reported (Kreier et al. 1962; Laird et al. 1988; Waldrup et al. 1989; Kocan and Kocan, 1991), the present study constitutes the first evidence of *T. cervi* infection in South American cervids. Indeed, since 47.6% (10/21) of the study population exhibited nPCR-positive samples, it is probable that the incidence of infection by *T. cervi* amongst the populations of *M. gouazoubira* and *B. dichotomus* is high. In this context, it is important to know if the cervid population are hemoparasite carriers since, when exposed to stress, the animals may become immunosuppressed thus favouring the emergence of the clinical signs of parasitism. The incidence of anaemia (PCV of 17%) in one of the animals with parasitemia indicates that clinical manifestations of *T. cervi* infection could occur after capture and handling of *M. gouazoubira* and *B. dichotomus* cervids.

The vector for *T. cervi* in cervids of North America is *A. americanum*, a species of tick whose presence has not been reported in South America. One of the key research objectives of our laboratory is to identify hemoparasites in the salivary glands of ticks that infest wild animals, and especially cervids, that may represent sources of disease for ruminants of economical importance. In the present study, therefore, DNA was extracted from the salivary glands of nymphs and adults of *A. cajennense*, a tick that is commonly found amongst wild Brazilian cervids, in order to assay for the presence of *Theileria* sp. Although all samples derived from *A. cajennense* were negative for *Theileria* sp., the tick cannot be rejected as a transmission vector for the hemoparasite since only a small number of samples were examined and the detection of *Theileria* sp. DNA was subject to various technical limitations. Studies employing molecular and morphological techniques are currently taking place in our laboratory in order to cast more light onto this subject and to establish the epidemiology of *Theileria* infection.

South America is considered to be an endemic area for *Babesia* spp., and especially the ruminant infecting species *B. bigemina* and *B. bovis* that cause high morbidity and mortality in cattle. However, the number of reports involving cervids affected by babesiosis in this region is somewhat

small (Deem et al. 2004; Duarte, 2006; Villas-Boas et al. 2009) in comparison with North America where the occurrence of the disease is considerably higher (Emerson and Wright, 1968; Waldrup et al. 1989, 1992; Holman et al. 2000; Cantu et al. 2007, 2009). The present study revealed that only two of the animals studied (9.5%) were nPCR-positive for *B. bigemina* or *B. bovis*, although 23.8% of the population were infested by *R. microplus*. The incidence of parasitic infection reported here is lower than values reported previously for Brazilian cervids (Machado and Müller, 1996; Duarte, 2007; Villas-Boas et al. 2009). Although our sample population was rather small, the results are relevant because of the close proximity between domestic and wild ruminants (Duarte, 2006). According to Duarte (2007), the prevalence of hemoparasites in cervids that inhabit conservation areas (implying an absence of contact with domestic ruminants) reflects the real sanitary situation of the wild population, whilst the occurrence of hemoparasites in cervids that live close to farms may be influenced by the presence of infectious agents that affect cattle.

Although diagnosis of infection is normally achieved through the examination of blood smears, this method shows poor sensitivity owing to the low level of parasitemia in animals infected with *T. cervi*. Furthermore, the differential diagnosis between *T. cervi* and *B. bovis* by direct blood examination is not facile even though these hemoparasites do present distinctive morphological characteristics, for example, the chromatin in *Theileria* trophozoites appears in the form of a cap or demilune covering the pole and extending down the sides, whereas in *Babesia* trophozoites it is normally rounded or extending down one side only (Kreier, 1977). Generally, therefore, the direct method is not reliable enough for distinguishing between these hemoparasites and most especially when both species occur together in endemic areas. In the present study, nPCR was shown to be very sensitive and should, therefore, be employed in the laboratory analysis of blood derived from wild animals. This type of procedure will provide more consistent data for mapping the distribution of hemoparasites that affect the wild fauna of Brazil.

5. Conclusion

In a population of wild and captive cervids, 71.4% of the animals were infected with hemoprotozoa, including *T. cervi* (47.6%), *Theileria* sp. (14.3%), *B. bovis* (4.8%) and *B. bigemina* (4.8%). Only one of the wild infected cervids exhibited accentuated anaemia (PCV = 17%). This is first report of the occurrence of *Theileria* spp. in Brazilian cervids.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), to IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), to Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, to conservation station Fazenda Engenho d'água, to researches Paula Senra and Ana Flávia Dias.

References

- Aragão, H., Fonseca, F., 1961. Notas de ixodologia VIII. Lista e chave para representantes da fauna Ixodológica brasileira. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 59, 115–129.
- Cançado, P.H.D., Zucco, C.A., Piranda, E.M., Faccini, J.L.H., Mourão, G.M., 2009. Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 42–46.
- Cantu, A.C., Ortega-S, J.A., Mosqueda, J., Garcia-Vazquez, Z., Henke, S.E., George, J.E., 2007. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northern Mexico. J. Wildl. Dis. 43, 504–507.
- Cantu, C.A., Ortega-S, J.A., Garcia-Vazquez, Z., Mosqueda, J., Henke, S.E., George, J.E., 2009. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in north-eastern Mexico. J. Parasitol. 95, 536–542.
- Chae, J., Waghela, S.D., Craig, T.M., Kocan, A.A., Wagner, G.G., Holman, P.J., 1999. Two *Theileria cervi* SSU rRNA gene sequence types found in isolates from White-tailed-deer and Elk in North America. J. Wildl. Dis. 35, 458–465.
- Deem, C.L., Noss, A.J., Villarreal, L., Uhart, M.M., Karesh, W.B., 2004. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco. Bolivia. J. Wildl. Dis. 40, 92–98.
- Duarte, J.M.B. (Ed.), 1997. Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocercus*, *Ozotocerus* e *Mazama*. FUNEP, Jaboticabal.
- Duarte, J.M.B., 2006. *Artiodactyla – Cervidae* (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). In: Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. (Eds.), *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 641–664.
- Duarte, J.M.B., 2007. Saúde populacional em cervídeos, o desafio da Medicina da Conservação. In: One World-One Health: Brazil 2007 – Symposium Healthy Ecosystems, Livestock and Human Livelihoods: An Innovative Public–Private Partnership, Available at URL <http://www.oneworldonehealth.org/oct2007/presentations/duarte.html>.
- Emerson, H.R., Wright, W.T., 1968. The isolation of a *Babesia* in white-tailed deer. J. Wildl. Dis. 4, 142–144.
- Fowler, M.E., 1993. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Han, J., Jang, H., Lee, S., Na, K., 2009. High prevalence of *Theileria* sp. in wild Chinese deer (*Hydropotes inermis argyropus*) in South Korea. Vet. Parasitol. 164, 311–314.
- Höfle, U., Vicente, J., Nagore, D., Hurtado, A., Peña, A., de La Fuente, J., Gortazar, C., 2004. The risks of translocating wildlife: pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. Vet. Parasitol. 126, 387–395.
- Holman, P.J., Madeley, J., Craig, T.M., Allsopp, B.A., Allsopp, M.T., Petrini, K.R., Waghela, S.D., Wagner, G.G., 2000. Antigenic, phenotypic and molecular characterization confirms *Babesia odocoilei* isolated from three cervids. J. Wildl. Dis. 36, 518–530.
- Inokuma, H., Tsuji, M., Kim, S., Fujimoto, T., Nagata, M., Hosoi, E., Arai, S., Ishihara, C., Okuda, M., 2004. Phylogenetic analysis of *Theileria* sp. from sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. Vet. Parasitol. 120, 339–345.
- Jain, N.C., 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Kocan, A., Kocan, K.M., 1991. Tick-transmitted protozoan diseases of wildlife in North America. Bull. Soc. Vector Ecol. 16, 94–108.
- Kreier, J.P. (Ed.), 1977. *Parasitic Protozoa IV*. Academic Press, London.
- Kreier, J.P., Ristic, M., Watrach, A.M., 1962. *Theileria* sp. in a deer in the United States. Am. J. Vet. Res. 23, 657–662.
- Laird, J.S., Kocan, A.A., Kocan, A.A., Presley, S.M., Hair, J.A., 1988. Susceptibility of *Amblyomma americanum* to natural and experimental infections with *Theileria cervi*. J. Mol. Biol. 269, 203–213.
- Machado, R.Z., Müller, E., 1996. Frequência de anticorpos contra *Babesia* em Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal e no Parque das Emas. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), *Relatório Final de Pesquisas do Projeto Veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus)*. FNMA, Brasília, pp. 124–132 (cited in Duarte, 2006).
- Perry, B.D., Nichols, D.K., Cullom, E.S., 1985. *Babesia odocoilei* Emerson and Wright, 1970, in white-tailed-deer, *Odocoileus virginianus* in Virginia. J. Wildl. Dis. 21, 149–152.
- Ristic, M., Kreier, J.P. (Eds.), 1981. *Babesiosis*. Academic Press, New York.
- Serra-Freire, N.M., Teixeira, R.H.F., 1993. Registro do parasitismo por *Haemaphysalis kohlsi* no pavilhão auricular de *Mazama gouazoubira* em Piedade, São Paulo, An. XVII Cong. Soc. Zoológicas do Brasil.
- Szabó, M.P.J., Labruna, M.B., Pereira, M.C., Duarte, J.M.B., 2003. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocercus dichotomus*) from South-east Brazil: infestations before and after habitat loss. J. Med. Entomol. 40, 268–274.

- Villas-Boas, J.C., et al. 2007. Survey of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* deer in the Pantanal wet-land, Nhecolândia, Brazil. In: Babesia World Summit, 2, 2007, Palermo. Palermo: Lombardo Editore, 49, 109. Cited by Cançado, P.H.D., Zucco, C.A., Piranda, E.M., Faccini, J.L.H., Mourão, G.M., 2009. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18, 42–46.
- Waldrup, K.A., Kocan, A.A., Qureshi, T., Davis, D.S., Baggett, D., Wagner, G.G., 1989. Serological prevalence and isolation of *Babesia odocoilei* among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Texas and Oklahoma. *J. Wildl. Dis.* 25, 194–201.
- Waldrup, K.A., Moritz, J., Baggett, D., Magyar, S., Wagner, G.G., 1992. Monthly incidence of *Theileria cervi* and seroconversion to *Babesia odocoilei* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Texas. *J. Wildl. Dis.* 28, 457–459.
- Yasbly, M.J., Quick, T.C., Little, E., 2005. Theileriosis in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawn. *J. Wildl. Dis.* 41, 806–809.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R., 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* 89, 241–248.

5.1.2 Família Anaplasmataceae

5.1.2.1

Transboundary and Emerging Diseases

Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens of the Family Anaplasmataceae in Brazilian Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815)

J. A. G. Silveira, E. M. L. Rabelo and M. F. B. Ribeiro

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Keywords:

Anaplasmataceae; molecular detection; nested PCR; sequencing; deer; natural infection; cross-infection

Correspondence:

M. F. B. Ribeiro. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.
Tel.: +55 31 34092842;
Fax: +55 31 34092970; E-mail: mucioibr@icb.ufmg.br

Received for publication June 30, 2011

doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01278.x

Summary

Deer are important natural reservoir hosts of Anaplasmataceae. The present study used nested PCR and nucleotide sequencing to evaluate the occurrence of Anaplasmataceae species in 23 free-living and six captive specimens of the cervids *Mazama gouazoubira* and *Blastocerus dichotomus* in Minas Gerais State, Brazil. Blood samples were tested for the presence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. using nPCR assays and sequencing of the msp4, msp1 and 16S rRNA genes. The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available from GenBank using BLAST software. Of the animals investigated, 93.1% (27/ 29) were infected with haemoparasites including *Anaplasma marginale* (79.3%), *Ehrlichia chaffeensis* (3.4%), *Anaplasma bovis* (3.4%) and *Anaplasma* spp. (assigned to *A. platys* and *A. phagocytophilum*) (17.2%). Co-infection occurred in 20% (6/29) of the deer examined. Four (13.8%) were infected with *A. marginale* and *Anaplasma* sp., one (3.4%) was infected with *A. marginale* and *E. chaffeensis*, and one (3.4%) was infected with *A. marginale* and *A. bovis*. The results of the present study suggest that cross-protection does not occur in these deer. Immunological cross-reaction occurs when sera are tested diagnostically because these bacteria are closely related taxonomically, reinforcing the importance of molecular diagnosis followed by nucleotide sequencing.

Introduction

Anaplasmataceae are obligate intracellular bacteria found exclusively in membrane-bound vacuoles of the tick and in host cell cytoplasm (Dumler et al., 2001). Following reclassification of the family Anaplasmataceae, the *Ehrlichia phagocytophila*/*Anaplasma* group includes *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis* (formerly *Ehrlichia bovis*), *A. phagocytophilum* (formerly *E. phagocytophila*, *E. equi* and the human granulocytic ehrlichiosis-human granulocytic ehrlichiosis agent) and *A. platys* (formerly *E. platys*). The *Ehrlichia canis*/*Cowdria* group includes the species *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* and *E. ruminantium* (Dumler et al., 2001; Kocan et al., 2008).

Anaplasma marginale, *A. centrale* and *A. ovis* are found in erythrocytes of ruminants. *Anaplasma marginale* is the

most pathogenic of the species, responsible for extensive economic losses in tropical and subtropical areas (Guglielmo, 1995).

Anaplasma bovis is a rickettsial organism found in monocytes of ruminants. Clinical signs of infection consist of sporadic fever lasting for several weeks, reduced body weight, and possibly death of naive or stressed cattle (Losos, 1986; Sreekumar et al., 1996). *Anaplasma phagocytophilum* infects humans and a wide range of other animal hosts including rodents, ruminants, felids, horses, donkeys, dogs and birds (Madigan and Pusterla, 2000; Stuenkel, 2007).

Ehrlichia chaffeensis causes human monocytic ehrlichiosis (HME), a tick-borne zoonosis (Dawson et al., 1991). This pathogen is responsible for symptomatic infection in humans and persistent subclinical infections in deer and canids (Ewing et al., 1995; Dawson et al., 1996).

Deer can become infected by various members of the Anaplasmatocae, but the consequences of infection for deer health are not understood (Duarte, 2007). Haemoparasites are a serious problem in domestic ruminants and they can be in close contact with wild animals, particularly deer, in South America (Duarte et al., 2001). Anaplasmatocae have been detected in wild ruminants worldwide (Kuttler, 1984; Dawson et al., 1994; Little et al., 1998; de la Fuente et al., 2008). In Brazil, molecular evidences of *A. marginale* and *E. chaffeensis* have been described in cervids (Machado et al., 2006; Sacchi, 2009; Picoloto et al., 2010).

Molecular techniques have been used for diagnosis, molecular phylogeny and genetic diversity of members of the family Anaplasmatocae infecting cervids (Ewing et al., 1995; Machado et al., 2006; de la Fuente et al., 2008; Kawahara et al., 2009; Picoloto et al., 2010). The identification of infectious agents in wild animals is not only crucial for species protection, but also for providing valuable information regarding the epidemiological links of a disease. The aim of the present study was to evaluate the occurrence of Anaplasmatocae in free-living and captive cervids *Mazama gouazoubira* (brown brocket deer) and *Blastocercus dichotomus* (Brazilian marsh deer) from the State of Minas Gerais, Brazil, using nested PCR assays and nucleotide sequencing.

Materials and Methods

This study was carried out from June 2007 to October 2010. It was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CETEA/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil), under protocol n° 142/08, and by the Brazilian Institute for Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA, Belo Horizonte, MG, Brazil) under licence n° 16064-1.

Deer samples

The deer samples mainly comprised free-living *M. gouazoubira* (n = 23), but also captive *M. gouazoubira* (n = 2) and *B. dichotomus* (n = 4) held in the Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (Table 1). The newly caught deer were taken either to the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA (n = 21) or to the conservation station Fazenda Engenho d'Água, Ouro Preto, MG, Brazil (n = 2).

Blood sampling

Whole blood was collected from each deer in vacutainer tubes containing EDTA. Sampling of *M. gouazoubira* was performed within 2 days of capture. Aliquots of blood

samples were frozen and stored for subsequent DNA extraction.

DNA extraction and PCR amplification

DNA was extracted from 300 µl of blood using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions.

The PCR was performed in two stages, a conventional PCR followed by a nested PCR. An aliquot of the first amplified PCR product was used for a second PCR with a second set of primers. These were chosen to amplify the target sequence of the first PCR, thereby increasing sensitivity. Sets of primers were used to detect Anaplasmatocae species (Table 2). Twice-distilled water was used as the negative control (no DNA). As positive control, DNA was extracted from 300 µl of whole blood of host species of each target parasite. A calf experimentally infected with the UFMG1 strain of *A. marginale* was used for the amplification of the *msp4* and *msp1a* genes (Bastos et al., 2010); a naturally infected horse diagnosed by blood smear, nPCR and sequencing as *A. phagocytophilum*, was used for the amplification of the 16S rRNA region of granulocytic ehrlichiosis, and a dog infected with *E. canis* (Jaboticabal strain) (Moreira, 2001) was used for the amplification of the 16S rRNA region of monocytic ehrlichiosis. A BLASTN search was performed to confirm whether the primers NS16SCH2 forward and reverse could be used to amplify *E. canis* samples. The primers presented 100% homology to sequences present in the *E. canis* 16S rRNA sequence (accession number: EF195134.1; AF536827.1; GU810149.1; EU491504.1).

The first reaction mixture comprised 1.2 µl dNTPs (10 mM), 0.15 µl Taq polymerase (0.05 U), 1.5 µl reaction buffer IB (1×), 0.6 µl of a solution containing the mixed primers (10 µM) and 10.05 µl sterile ultra-pure water. A 1.5 µl aliquot of the DNA template was added to the reaction mixture to give a final volume of 15 µl.

The second reaction mixture comprised 2.0 µl dNTPs (10 mM), 0.25 µl Taq polymerase (0.05 U), 2.5 µl reaction buffer IB (1×), 1.0 µl of a solution containing the mixed primers (10 µM) and 16.75 µl sterile ultra-pure water. An aliquot (2.5 µl) of amplicon obtained in the first reaction was added to the reaction mixture to give a final volume of 25 µl. Amplification was carried out under the conditions already described.

Amplification was performed using an Eppendorf Mastercycler³ (Eppendorf, São Paulo, SP, Brazil) thermocycler. The programme used to amplify *A. marginale/A. ovis* and *E. chaffeensis* was as follows: 94°C for 5 min (initial denaturation step); 30 cycles of 92°C for 1 min (denaturation), 54°C for 1 min (annealing), 72°C for 2 min

Table 1. Anaplasmataceae infection of 29 deer from the state of Minas Gerais, Brazil as determined by nested PCR, followed by sequencing and characterization of the cervids examined with respect to sex, age and species

Species	Sample	Age/sex ^a	<i>Anaplasma</i> spp.			
			<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	(assigned to <i>A. platys</i> and <i>A. phagocytophilum</i>)	<i>Anaplasma bovis</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
<i>Mazama gouazoubira</i>	MGI1	Adult male				
	MGI2	Adult female				
	MGI3	Adult male		+		+
	MGI4	Young female				+
	MGI5	Adult female				+
	MGI6	Adult male				+
	MGI7	Fawn female				+
	MGI8	Adult female				+
	MGI9	Fawn female				
	MGI10	Young female				+
	MGI11	Adult female		+		+
	MGI12	Adult female				+
	MGI13	Fawn female				
	MGI14	Fawn male				+
	MGI15	Adult male		+		+
	MGI16	Unkown			+	+
	MGI17	Adult male			+	+
	MGI18	Young female				+
	MGI19	Fawn female				+
	MGI20	Young male				+
	MGI21	Adult male			+	
	MGE1	Adult male				+
	MGE2	Adult male				+
MGZBH1	Adult female				+	
MGZBH2	Adult male					
<i>Blastocercus dichotomus</i>	BDZBH1	Adult female				
	BDZBH2	Adult male				+
	BDZBH3	Adult male				+
	BDZBH4	Adult male			+	+
	Total		1	5	1	23

Young: fawn features without hair with white spots; Adult: mature animal features.

^aDetermination of the age: Fawn: 1–2 months.

(extension); and a final extension step at 72°C for 8 min. Following amplification, reaction mixtures were maintained at 12°C. PCR amplicons were separated by electrophoresis on 1% agarose gel (40 min, 100 V), stained with gel red (Biotium, São Paulo, SP, Brazil) and visualized under ultraviolet light. The primers to granulocytic ehrlichiosis were amplified following Silaghi (2008).

Some samples positive for *msh4* genes were also characterized for the *A. marginale msp1a*-specific gene, which has been previously demonstrated to code to a protein presenting a different number and composition of tandem repeats (de la Fuente et al., 2007). The programme used was: 94°C for 5 min; 30 cycles each of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 90 s; and a final extension step at 72°C for 5 min.

Products were separated by electrophoresis, visualized as already described and subsequently purified with the

aid of QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotechnology Brasil, São Paulo, Brazil) following the manufacturer's instructions. Sequencing of the purified amplicons was performed on a MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) using second reaction primers. Sequences were aligned, edited and analysed at URL <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> and using MEGA 5.0 software. The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available at GenBank using BLAST software. Phylogenetic analyses of *msh1a* genes were implemented using MEGA 5.0 version (Tamura et al., 2011).

Nucleotide sequence accession numbers

The *msh4*, *msh1a* and 16S rRNA gene sequences have been deposited in the GenBank under accession numbers:

Table 2. Specific primers for the detection of species of the Anaplasmatocae

Specificity	Primer sequence (5' para 3')	Name	Product size (pb)	Target	Reference
<i>Anaplasma marginale</i> / <i>Anaplasma ovis</i>					
1st reaction	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC	MSP45	872	msp4	de la Fuente et al., 2008
	CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC	MSP43			
2nd reaction	CGCCAGCAAACCTTTCCAAA	AnapF	294	msp4	^a
	ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapR			
<i>Anaplasma marginale</i>					
1st reaction	GCTTACGCCGCCCTGCGCC	MSP1aP	2000	msp1a	de la Fuente et al., 2001a,b,c
	GCATTACAACGCAACCGTTGA	MSP1a3			
2nd reaction	TGTGGTTGCTCTTTCCCGATGT	MSP1aNf	800	msp1a	Bastos et al., 2009
	CACGCCAAACATGAAGTCGACAA	MSP1aNR			
Monocytic Ehrlichiae					
1st reaction	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	NS16SCH1F	1195	16S rRNA	Kawahara et al., 2009
	ACAACTTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1R			
2nd reaction	GGGCACGTAGGTGGACTAG	NS16SCH2F	443	16S rRNA	Kawahara et al., 2009
	CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2R			
Granulocytic Ehrlichiae					
1st reaction	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	GE3a	932	16S rRNA	Massung et al., 1998
	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE10r			
2nd reaction	AACGGATTATTCCTTTATAGCTTGCT	GE9f	546	16S rRNA	Massung et al., 1998
	GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	GE2			

^a *Anaplasma* MSP4 fragment identified by aligning sequences from *Anaplasma marginale*/*Anaplasma ovis* available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), (gi|110535336; gi|110535352; gi|110535367; gi|110535375).

JN022556; JN022557; JN022558; JN022559; JN022560; JN022561; JN022562; JN022563; JN022564; JN022565; JN022566; JN022567; JN022568; JN022569; JN022570; JN022571; JN022572; JN022573; JN022574; JF952888; JF952889; JF952890; JF952891; JF952892; JF952893; JF952894; JN885130; JN885131; JN885132; JN885133; JN885134; JN885135.

Results

Deer blood samples were tested for infection with the *Ehrlichia phagocytophila*/*Anaplasma* group and *E. chaffeensis*, by nPCR analysis. PCR products were sequenced to determine the micro-organism identity. The msp4 and msp1a genes fragments were used for *A. marginale*, and 16S rRNA gene fragments were used for other *Anaplasma*/*Ehrlichia* species.

Based on the sequencing results of the msp4 gene fragment, 79.3% of deer tested positive for *A. marginale* (23/29). This comprised 73.9% (17/23) of free-living *M. gouazoubira*, 50% (1/2) of captive *M. gouazoubira* and 100% (4/4) of captive *B. dichotomus*. BLASTN analysis of the amplicon sequences from msp4 genes showed 94-100% similarity with *A. marginale* strains deposited in GenBank.

The strains positive to the msp4 gene fragment were tested for MSP1a for molecular characterization of the isolates through tandem analysis of the translated gene product, which varies among geographic isolates (de la

Table 3. MSP1a repeat sequence comparison between strains MGI8, MGI10, MGI11, MGI15, MGI19 and BDZBH4

Anaplasma marginale genotype	Encoded sequence	Repeat form
	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG-	A
MGI8	PG-*****I**I***DQ*****	Undescribed
MGI10	A*****L***G*****	Undescribed
MGI11	S*G*T*****L***DQ*****	Undescribed
MGI15	T*****L*P*GQ*****S***	Undescribed
	T*****L***DQ*****	13
	T*****L***DQ*****S***	18
MGI19	AE*****L***DQ*****	Undescribed
BDZBH4	AE*****L***DQ*****	Undescribed
	AE**E*****L***DQ*****	Undescribed (=119)

Fuente et al., 2007). Six strains (MGI8, MGI10, MGI11, MGI15, MGI19 and BDZBH4) were positive and have been successfully sequenced. Six MSP1a repeat sequences that have not been previously described, and the repeat forms 13 and 18, were identified (Table 3).

One free-living *M. gouazoubira* tested was positive for *E. chaffeensis* primers NS16SCH1 and 2), and BLAST analysis showed 100% Query coverage and 99% maximum identity, with *E. chaffeensis* strains deposited in GenBank (CP000236.1; AF147752.2; U60476.1; U86665.1).

^a 2011 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

The samples amplified with the primers for granulocytic ehrlichiosis (Table 2) showed identity with *A. bovis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys*. One *B. dichotomus* was positive only for *A. bovis* (99% Query coverage, and 98% maximum identity) (GU556627.1; U03775.1). Five samples from free-living deer showed identity with both *A. platys* (Query coverage and maximum identity 99% or 100%) and *A. phagocytophilum* (Query coverage 100% and maximum identity 98% or 99%). The sequences tested differed from *A. phagocytophilum* deposited sequences (GU556621.1, HM138366.1) in four nucleotides along the sequences, whereas there were four nucleotide differences in the primer GE9f when compared to the *A. platys* sequences in NCBI (GQ395384.1, AY821826.1). Therefore, it was not possible to define the organism from which these sequences were derived.

Co-infection occurred in 6 of 29 (20%) deer examined (five *M. gouazoubira* and one *B. dichotomus*). Four animals (13.8%) were infected with *A. marginale* and *Anaplasma* sp. (identified as *A. platys* and *A. phagocytophilum* by comparison with sequences available at GenBank using BLAST software), one animal (3.4%) was infected with *A. marginale* and *E. chaffeensis*, and one (3.4%) was infected with *A. marginale* and *A. bovis*.

Discussion

Our study showed that *M. gouazoubira* and the *B. dichotomus* held in Minas Gerais were naturally infected with four species of Anaplasmatocae and that co-infection occurred. In addition, other tick-borne pathogens of the order Piroplasmida have been ascribed to the same cervid population (Silveira et al., 2011). Machado et al. (2006) and Picoloto et al. (2010) have shown that Brazilian cervids can be infected with *E. chaffeensis* and *A. marginale*. Wild deer from two Japanese islands were naturally infected with four species of Anaplasmatocae with occurrences of co-infection (Kawahara et al., 2006). These data suggest that deer may function as sentinel species for determining the geographic distribution of these organisms.

Bovine anaplasmosis is reported to be enzootic in the cattle of South America (Guglielmo, 1995). Several major protein surfaces (MSP) involved in interactions with vertebrate and invertebrate host cells have been used for molecular characterization of *A. marginale* isolates (de la Fuente et al., 2001a). The *msp4* genes of *A. marginale* have been used in phylogeographic studies as this gene exhibits sufficient sequence variation (de la Fuente et al., 2001b). There are no substantiating field studies showing that wildlife can serve as an infection reservoir for cattle, and therefore, the control of *A. marginale* has been focused on cattle and ticks rather than on wild ruminants

(Aubry and Geale, 2010). However, the present study demonstrated a high per cent of deer infected by *A. marginale* (79.3%), a higher prevalence of infection in naturally infected deer than found in other studies using molecular analysis (Machado et al., 2006; Picoloto et al., 2010).

Three of the five *M. gouazoubira* fawns examined were positive for *A. marginale* (Table 1). The fawns were estimated to be <2 months old, based on fur colouration (Tiepolo and Tomas, 2011). These data show that *M. gouazoubira* can be infected by this pathogen at an early age. In the present study, the majority of the free-living animals were captured from livestock rearing or anthropogenic areas, and the biologic vector of *A. marginale*, the tick *Rhipicephalus microplus*, has been found on some of these deer (Silveira et al., 2011).

Major surface protein, MSP1a, has been shown to be involved in adhesion for both bovine erythrocytes and tick cells, (McGarey and Allred, 1994; McGarey et al., 1994). The *msp1a* genes have been used to compare *A. marginale* geographic strains through molecular weight and the variable number of tandem 23–31 amino acid repeats (de la Fuente et al., 2001c, 2004). Six MSP1a repeat sequences that have not been previously described were identified in the present study, reinforcing the concept of genetic heterogeneity of *A. marginale* strains in endemic regions worldwide (de la Fuente et al., 2007). It is conceivable that an increase in the number of analysed sequences will lead to an increase in the number of tandems. However, there is a possibility that these new tandem sequences are because of host specificity. The present study analysed *A. marginale* strains isolated from deer and found different tandems to the *msp1a* gene, which is not unexpected, given the high number of tandems described for this gene (de la Fuente et al., 2007). The repeat form 13 has been found in *A. marginale* strains from Latin America and South Africa, locations with a common tick vector, *Boophilus* spp. (de la Fuente et al., 2007). This repeat form was identified in the present study. The tick *R. microplus*, formerly *Boophilus microplus*, was identified on various cervids analysed in this study (Silveira et al., 2011). Therefore, it is possible that this tick species could be responsible for transmitting *A. marginale* to deer in the region under study.

Ehrlichia chaffeensis causes HME, a tick-borne zoonosis (Dawson et al., 1991). White-tailed-deer, *Odocoileus virginianus*, have been implicated as a potential reservoir for *E. chaffeensis* in the United States, with the tick *Amblyomma americanum* as the principal vector (Dawson et al., 1994; Ewing et al., 1995). The first report of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazil was detected by nPCR in *B. dichotomus*; hence, the species was implicated as a potential reservoir for *E. chaffeensis* (Machado et al., 2006).

An indirect fluorescent antibody test was used to assess the *B. dichotomus* population from the same region, and *E. chaffeensis* antibodies were detected in more than 80% of the sera tested. In DNA analysis, *E. chaffeensis* were detected in more to 45% to the same samples (Sacchi, 2009). The present study showed *M. gouazoubira* to be infected with *E. chaffeensis*, reinforcing the role of cervids as a potential reservoir for *E. chaffeensis*.

Anaplasma bovis was detected in a single captive *B. dichotomus* that had been maintained for some years in the Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte Minas Gerais. While *Anaplasma bovis* infection has been detected in deer from Japan and South Korea (Kawahara et al., 2006; Lee et al., 2009), to our knowledge, this is the first report of *A. bovis* infection in deer from Brazil.

The amplified products from the five samples from *M. gouazoubira* showed identity with *A. platys* and *A. phagocytophilum*. Four nucleotide differences between the deer strains and *A. phagocytophilum* were evident along the sequences, but were insufficient to allow species identification. *Anaplasma* sp. from white-tailed deer isolated by tick cell culture was assigned to *A. phagocytophilum*, *A. platys*, and *A. marginale*, with highest similarity to *A. platys* followed by *A. phagocytophilum* (Munderloh et al., 2003). *Anaplasma phagocytophilum* was identified by serologic methods and by PCR test in Brazilian marsh deer (*B. dichotomus*), and sequences of these samples demonstrated relatedness to a sample of *Anaplasma* spp. which came from the small intestine of *Anopheles* mosquitoes, as well as samples of *A. platys* (Sacchi, 2009).

Anaplasma platys has been report in dogs in Brazil (Santos et al., 2007; Ramos et al., 2010), and in the USA, the white-tailed-deer is a potential reservoir of *A. phagocytophilum* (Munderloh et al., 2003). The commercial ELISA KIT (IDEXX[®]) is capable of detecting *A. phagocytophilum* antibodies, and according to the manufacturer, it appears to have a serological cross-reaction with *A. platys*, reinforcing the close relatedness between these agents (Ferreira et al., 2008). However, according to Uilenberg et al. (2004), gene sequences from small portions of the genome should be carefully analysed to reveal taxonomic differences.

The suspected tick vector for *A. platys* in Brazil is *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2008), and parasitism by *R. sanguineus* ticks of hosts other than dogs appears to be rare in some areas where they occur (Labruna and Pereira, 2001; Walker et al., 2005). Hard ticks of the genus *Ixodes* are vectors of *A. phagocytophilum*. The main vectors in Europe and the east and west coasts of North America are *Ixodes ricinus*, *I. scapularis* and *I. pacificus*, respectively (Parola et al., 2005).

The vectors of *A. phagocytophilum*, *A. platys* and *A. bovis* in Brazil are not known, but the ticks found on the

cervids of the present study were *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Silveira et al., 2011).

Conclusion

Brazilian cervids can be infected with many species of Anaplasmataceae. The results of the present study suggest that cross-protection does not occur in these animals. Deer were co-infected with members of the Anaplasmataceae, reinforcing the importance of molecular diagnosis followed by nucleotide sequencing to identify co-occurring species that may infect animals that have not previously been considered natural hosts to some of these micro-organisms.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), to IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), to Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, to conservation station Fazenda Engenho d'água and to Veterinary Clinics Cães e amigos and Leonardo Maciel. We thank Lucidus Consultancy for improving the English and for all contributions that allowed us to execute the present study.

References

- Aubry, P., and D. W. Geale, 2010: A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30.
- Bastos, C. V., L. M. F. Passos, M. M. C. Vasconcelos, and M. F. B. Ribeiro, 2009: In vitro establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz. J. Microbiol.* 40, 399–403.
- Bastos, C. V., L. M. F. Passos, E. J. Facury-Filho, E. M. Rabelo, J. de la Fuente, and M. F. B. Ribeiro, 2010: Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet. J.* 186, 374–378.
- Dantas-Torres, F., 2008: Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit. Vectors* 8, 1–17.
- Dawson, J. E., B. E. Anderson, D. B. Fishbein, J. L. Sanchez, C. S. Goldsmith, K. H. Wilson, and C. W. Duntley, 1991: Isolation and characterization of an Ehrlichia sp. from a patient with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2741–2745.
- Dawson, J. E., J. E. Childs, K. L. Biggie, D. Moore, D. Stallknecht, J. Shaddock, J. Bouseman, E. Hofmeister, and J. G. Olson, 1994: White-tailed-deer as a potential reservoir of Ehrlichia spp. *J. Wildl. Dis.* 30, 162–167.

- Dawson, J. E., K. L. Biggie, C. K. Warner, K. Cookson, S. Jenkins, J. F. Levine, and J. G. Olson, 1996: 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.
- Duarte, J. M. B., 2007: Saúde populacional em cervídeos, o desafio da Medicina da Conservação. One World-One Health: Brazil 2007 – Symposium Healthy Ecosystems, Live-stock and Human Livelihoods: An Innovative Public-Private Partnership. Available at <http://www.oneworldonehealth.org/oct2007/presentations/duarte.html> (accessed January 24, 2010).
- Duarte, J. M. B., M. L. Merino, S. Gonzalez, A. L. V. Nunes, J. M. Garcia, M. P. J. Szabo, J. R. Pondolfi, I. G. Arantes, A. A. do Nascimento, R. Z. Machado, J. P. Araujo Jr, J. L. Ca-tao-Dias, K. Werther, J. E. Garcia, R. J. S. Girio, and E. R. Matushima, 2001: Order Artiodactyla, family Cervidae (deer). In: Fowler, M. E. and Z. S. Cubas (eds), *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*, pp. 402–422. Iowa State University Press, Ames, IA. Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Daseh, G. A. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Ramgirwa, 2001: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the other Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designations of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.
- Ewing, S. A., J. E. Dawson, A. A. Kocan, R. W. Barker, C. K. Warner, R. J. Panciera, J. C. Fox, K. M. Kocan, and E. F. Blouin, 1995: Experimental transmission of Ehrlichia chaffeensis (Rickettsiales: Ehrlichiae) among White-tailed-deer by Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32, 368–374.
- Ferreira, R. F., A. M. F. Cerqueira, A. M. Pereira, P. B. Velho, R. R. M. Azevedo, I. L. F. Rodrigues, and N. R. P. Almosny, 2008: Cross-reaction evaluation of PCR-Anaplasma platys positive dogs tested to Anaplasma phagocytophilum antibodies by commercial ELISA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 5–8.
- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, and K. M. Kocan, 2001a: Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen Anaplasma marginale to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31, 145–153.
- de la Fuente, J., R. A. Van Den Bussche, and K. M. Kocan, 2001b: Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* 97, 65–76.
- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, S. D. Rodríguez, M. A. Garcia, and K. M. Kocan, 2001c: Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen Anaplasma marginale. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 163–173.
- de la Fuente, J., L. M. F. Passos, R. A. Van Den Bussche, M. F. B. Ribeiro, E. J. Facury-Filho, and K. M. Kocan, 2004: Genetic diversity and molecular phylogeny of Anaplasma marginale isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 121, 307–316.
- de la Fuente, J., P. Ruybal, M. S. Mtshali, V. Naranjo, L. Shuqing, A. J. Mangold, S. D. Rodríguez, R. Jiménez, J. Vicente, R. Moretta, A. Torina, C. Almazán, P. M. Mbatia, S. de Echazide Torioni, M. Farber, R. Rosario-Cruz, C. Gortazar, and K. M. Kocan, 2007: Analysis of world strains of Anaplasma marginale using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* 119, 382–390.
- de la Fuente, J., F. Ruiz-Fons, V. Naranjo, A. Torina, O. Rodríguez, and C. Gortazar, 2008: Evidence of Anaplasma infections in European roe deer (Capreolus capreolus) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.* 84, 382–386.
- Guglielmone, A. A., 1995: Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57, 109–120.
- Kawahara, M., Y. Rikihisa, Q. Lin, E. Isogai, K. Tahara, A. Itagaki, Y. Hiramitsu, and T. Tajima, 2006: Novel genetic variants of Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma bovis, Anaplasma centrale, and a novel Ehrlichia sp. in wild deer and ticks on two major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1102–1109.
- Kawahara, M., T. Tajima, H. Torii, M. Yabutani, J. I. M. Harasawa, E. Isogai, and Y. Rikihisa, 2009: Ehrlichia chaffeensis infection of Sika deer, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1991–1993.
- Kocan, K. M., J. de la Fuente, and E. F. Blouin, 2008: Advances toward understanding the molecular biology of the Anaplasma-tick interface. *Front. Biosci.* 13, 7032–7045.
- Kuttler, K. L., 1984: Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. *J. Wildl. Dis.* 20, 12–20.
- Labruna, M. B., and M. C. Pereira, 2001: Carrapatos em cães no Brasil. *Clín. Vet.* 30, 24–32.
- Lee, M., D., Yu, J. Yoon, Y. Li, J. Lee, and J. Park, 2009: Natural co-infection of Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma bovis in a deer in South Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 101–103.
- Little, S. E., D. E. Stallknecht, J. M. Lockhart, J. E. Dawson, and W. Davidson, 1998: Natural coinfection of a white-tailed deer (Odocoileus virginianus) population with three Ehrlichia spp. *J. Parasitol.* 84, 897–901.
- Losos, G. J., 1986: *Infectious Tropical diseases of Domestic animals*. Longman Scientific & Technical, Ottawa, ON, Canada, pp. 938.
- Machado, R. Z., J. M. B. Duarte, A. S. Dagnone, and M. P. J. Szabo, 2006: Detection of Ehrlichia chaffeensis in Brazilian marsh deer (Blastocerus dichotomus). *Vet. Parasitol.* 139, 262–266.
- Madigan, J. E., and N. Pusterla, 2000: Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. North Am Equine Pract.* 16, 487–499.
- Massung, R. F., K. Slater, J. H. Owens, W. L. Nicholson, T. N. Mather, V. B. Solberg, and J. G. Olson, 1998: Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1090–1095.

- McGarey, D. J., and D. R. Allred, 1994: Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial bodysurface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62, 4587–4593.
- McGarey, D. J., A. F. Barbet, G. H. Palmer, T. C. McGuire, and D. R. Allred, 1994: Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62, 4594–4601.
- Moreira, S. M., 2001: Estudo retrospectivo (1998–2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte: avaliação clínica e laboratorial de infecções experimentais. PhD thesis, Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Brazil.
- Munderloh, U. G., C. M. Tate, M. J. Lynch, E. W. Howerth, T. J. Kurtti, and W. R. Davidson, 2003: Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from White-tailed-deer by tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4328–4335.
- Parola, P., B. Davoust, and D. Raoult, 2005: Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* 36, 469–492.
- 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, and C. R. Madruga, 2010: Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 186–188.
- Ramos, R., C. Ramos, F. Araújo, R. Oliveira, I. Souza, D. Pimentel, M. Galindo, M. Santana, E. Rosas, M. Faustino, and L. Alves, 2010: Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (northeastern Brazil). *Parasitol. Res.* 107, 1115–1120.
- Sacchi, A. B. V., 2009. Identificação e Prevalência de Agentes Rickettsiais (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus*) utilizando métodos sorológico e molecular. PhD thesis, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, Brazil.
- Santos, F., J. S. Coppede, A. L. A. Pereira, L. P. Oliveira, P. G. Roberto, R. B. R. Benedetti, L. B. Zucoloto, F. Lucas, L. Sobreira, and M. Marins, 2007: Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet. J.* 179, 145–148.
- Silaghi, C. H. A., 2008: Prevalence and genetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and spotted fever group rickettsiae in the tick *Ixodes ricinus* in urban and periurban sites in southern Germany. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany.
- Silveira, J. A. G., E. M. L. Rabelo, and M. F. B. Ribeiro, 2011: Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 177, 61–66.
- Sreekumar, C., S. Anandan, S. Balasundaram, and G. Rajavelu, 1996: Morphology and staining characteristics of *Ehrlichia bovis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 79–83.
- Stuen, S., 2007: *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 31, 79–84.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, 2011: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tiepolo, L. M., and W. M. Tomas, 2011: Família Cervidae. In: Reis, N. R., A. L. Peracchi, W. A. Pedro and I. P. Lima (eds), *Ordem Artiodactyla*, pp. 293–307. *Mamíferos do Brasil*, Londrina.
- Uilenberg, G., F. Thiaucourt, and F. Jongejan, 2004: On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp. Appl. Acarol.* 32, 301–312.
- Walker, J. B., J. E. Keirans, and I. G. Horak, 2005: *The Genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 643.

5.1.3 Resultados e discussão que não constam nos artigos publicados

5.1.3.1 Detecção de hemoprotozoários e ixodídeos em cervídeos capturados após submissão do artigo do item 5.1.1.1

Após a submissão do artigo, foram capturados mais oito veados-catingueiros de vida livre (MGI14 a MGI21). No nPCR, sete (87,5%) foram positivos (MGI15 a MGI21) e após o sequenciamento nucleotídico, todos obtiveram similaridade com *T. cervi* (máxima identidade de 98% a 100%). Em três dos cervídeos foram realizados esfregaços sanguíneos e todos eles apresentaram trofozoítos intraeritrocíticos. O volume globular variou de 25 a 41%.

Em relação aos carrapatos, dos oito cervídeos examinados, quatro estavam infectados por carrapatos (MGI15 a MGI17 e MGI19). Dois animais estavam infestados por *Rhipicephalus microplus*, dois por *Dermacentor nitens* e dois por *Amblyomma cajennense*. A coinfeção ocorreu em dois animais, sendo que o MGI16 estava parasitado por *R. microplus* e *D. nitens* e o MGI17 por *R. microplus* e *A. cajennense* (TAB. 7).

Considerando todos os 29 cervídeos capturados no estado de Minas Gerais, 21 (72,4%) foram positivos no nPCR para hemoprotozoários. Das 21 amostras positivas, 16 (76,2%) obtiveram similaridade com *T. cervi*, três (14,3%) com *Theileria* sp., uma (4,7%) com *B. bovis* e uma (4,7%) com *B. bigemina*. Coinfecção com mais de uma espécie de Apicomplexa não foi detectada em nenhum dos animais. Dos 21 animais parasitados, dez (47,6%) eram machos adultos, sete (33,3%) eram fêmeas adultas, um (4,7%) era macho filhote, dois (9,5%) eram fêmeas filhotes e um (4,7%) não tinha dados.

Em relação aos 23 animais de vida livre, 18 (78,2%) estavam positivos no nPCR para hemoprotozoários. Dos animais positivos, 14 (77,7%) por *T. cervi*, três (16,6%) por *Theileria* sp. e um (5,5%) por *B. bigemina*. Dos 21 animais oriundos do IBAMA, 16 (76,2%) estavam parasitados por *Theileria* spp., sendo três (14,3%) por *Theileria* sp. e 13 (61,9%) por *T. cervi*. Em nenhum dos animais foi detectado *Babesia* spp. Dos dois animais oriundos da Fazenda Engenho-d'água, um (50%) estava parasitado por *B. bigemina* e o outro (50%) por *T. cervi*. Dos seis cervídeos da Fundação Zoobotânica de

Belo Horizonte, três (50%) estavam parasitados, sendo que dois (33,3%) estavam parasitados por *T. cervi*, e um (16,6%) por *B. bovis*. Considerando as espécies de cervídeos em cativeiro, dos dois *M. gouazoubira*, um estava parasitado por *T. cervi* e dos quatro *B. dichotomus*, em um foi detectado *T. cervi* e em outro *B. bovis* (TAB. 1).

TABELA 1

Frequência de infecção por hemoprotozoários nos cervídeos do estado de Minas Gerais, capturados em 2010, conforme a origem ou a espécie do animal

Animais	nPCR	<i>Theileria</i> sp.	<i>T. cervi</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
MG	21/29 (72,4%)	3/29 (10,3%)	16/29 (55,2%)	1/29 (3,4%)	1/29 (3,4%)
Vida livre	23/18 (78,2%)	3/23 (13%)	14/23 (60,8%)	1/23 (4,3%)	0/23
<i>M. gouazoubira</i>	16/21 (76,2%)	3/21 (14,3%)	13/21 (62%)	0/21	0/21
IBAMA	2/2 (100%)	0/2	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2
Fazenda Engenho	3/6 (50%)	0/6	2/6 (33,3%)	0/6	1/6 (16,6%)
Cativeiro	1/2 (50%)	0/2	1/2 (50%)	0/2	0/2
Zoo	2/4 (50%)	0/4	1/4 (25%)	0/4	1/4 (25%)
<i>M. gouazoubira</i>					
<i>B. dichotomus</i>					

A infestação por carrapatos foi observada somente nos cervídeos de vida livre (TAB. 2). Dos 23 animais de vida livre, onze (47,8%) estavam parasitados por carrapatos, sendo sete (30,4%) parasitados por *R. microplus*, oito (34,8%) por *D. nitens*, e seis (26%) por *A. cajennense*. A coinfeção ocorreu em sete (30,4%) dos 23 cervídeos, sendo que três (13%) estavam parasitados por *R. microplus* e *A. cajennense*, dois (8,7%) estavam parasitados por *R. microplus* e *D. nitens* e dois (8,7%) estavam parasitados por três espécies de ixodídeos. Dos onze *M. gouazoubira* infestados por carrapatos, quatro (36,4%) eram fêmeas adultas, quatro (36,4%) eram machos adultos, dois (18,2%) eram fêmeas filhotes e um (9%) cervídeo não tinha dados.

TABELA 2

Frequência da infestação por ixodídeos em *M. gouazoubira*, pertencentes ao estado de Minas Gerais, capturados em 2010, conforme a origem do animal

Animais	Parasitismo	<i>R. microplus</i>	<i>D. nitens</i>	<i>A. cajennense</i>	<i>R. microplus</i> e <i>D. nitens</i>	<i>R. microplus</i> e <i>A. cajennense</i>	<i>R. microplus</i> , <i>D. nitens</i> e <i>A. cajennense</i>
Vida livre	11/23 (47,8%)	7/23 (30,4%)	8/23 (34,8%)	6/23 (26%)	2/23 (8,7%)	3/23 (13%)	2/23 (8,7%)
IBAMA	10/21 (47,6%)	7/21 (33,3%)	7/21 (33,3%)	6/21 (28,6%)	2/21 (9,5%)	3/21 (14,3%)	2/21 (9,5%)
Fazenda Engenho	1/2 (50%)	0/2	1/2 (50%)	0/2	0/2	0/2	0/2

5.1.3.2 Estudo da transmissão dos hemoparasitos pelos ixodídeos

Amostras de hemolinfa foram coletadas de espécimes de *A. cajennense* e *R. microplus* oriundas dos cervídeos MGI11, MGI12 e MGI22. Nos exames de esfregaço de hemolinfa corados por Panótico Rápido, não foram encontrados esporocinetos de *Babesia/Theileria* ou corpúsculos de hemoparasitos nos hemócitos.

Diferentes reações de nPCR foram realizadas em DNA extraído de glândulas salivares de carrapatos oriundos dos cervídeos para a procura de parasitos dos gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma* e *Ehrlichia*. Foram analisadas as glândulas salivares de espécimes de *A. cajennense* oriundas dos cervídeos MGI11 e MGI19 (colhidas ninfas e analisadas as glândulas dos adultos, conforme metodologia descrita), de adultos de *D. nitens* que infestavam os cervídeos MGI8, MGI9 e MGE2 e de adultos de *R. microplus* oriundos do cervídeo MGI9 e MGI17.

Machos e fêmeas de *A. cajennense* oriundos das ninfas colhidas do espécime MGI11 não foram positivos em nenhuma reação de nPCR, apesar do sangue desse cervídeo ser positivo para *T. cervi*, *A. marginale* e *Anaplasma* sp. (similaridade com *A. phagocytophilum* e *A. platys*). Desses carrapatos, também foi realizada a análise morfológica da glândula salivar, corada com verde metil-pironina e não foi observada a hipertofria do ácino, que é sugestiva de infecção.

As glândulas salivares dos espécimes *A. cajennense* adultos oriundos das ninfas colhidas do espécime MGI19 apresentaram duas bandas no nPCR, porém, uma maior (\pm

500pb) e a outra menor (\pm 250pb) do que a banda para a região 16S rRNA de *Babesia/Theileria* (430 pb) (FIG. 2). Entretanto, o sequenciamento desses fragmentos não foi satisfatório e devido à limitação da quantidade desse material, não foi possível a repetição do método. O sangue do cervídeo MGI19 foi positivo para *T. cervi* e *A. marginale*.

O “pool” de glândulas salivares de machos e fêmeas de *D. nitens* oriundos do cervídeo MGI8 foi nPCR positivo para *Babesia/Theileria* e no sequenciamento houve similaridade com *Theileria* sp. (82% de identidade com *Theileria* sp. isolada de ruminante selvagem na China. Número de acesso: AY262121.1). Como a amostra não apresentou uma identidade muito elevada com as sequências depositadas no GenBank esse resultado não é conclusivo. Porém, no sangue total e no fígado do cervídeo MGI8, foi detectado *T. cervi*.

Já o “pool” de glândulas salivares de machos e fêmeas de *D. nitens* oriundos do cervídeo MGI9 apresentou uma banda de tamanho esperado para *Babesia/Theileria*, porém de fraca intensidade, não possibilitando o sequenciamento.

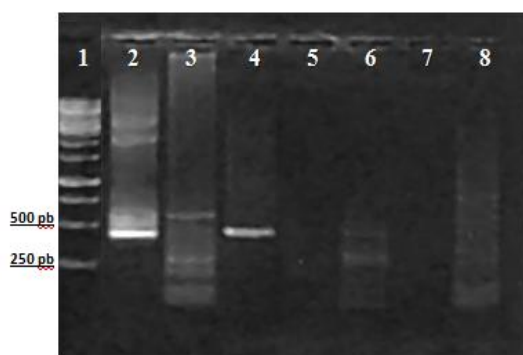


FIGURA 2: Análise dos produtos da nPCR em gel de agarose 1% corado com Gel Red. Primers: 1º reação: RIB19/RIB20; 2º reação: BabRumF/BabRumR. 1- Peso molecular (banda alvo: 430 pb); 2- Controle positivo *B. bovis/B. bigemina*; 3 a 6 – glândulas salivares de carrapatos parasitando cervídeos, sendo: 3- MGI19/ *A. cajennense*; 4- MGI8/*D. nitens*; 5- MGI9/ *B. microplus*; 6- MGI9/ *D. nitens*; 7- branco da 1º reação; 8- branco da 2º reação.

Machos e fêmeas de *R. microplus* oriundos do cervídeo MGI17 foram nPCR positivos para *Anaplasma* através da análise do gene *msp4*. Após o sequenciamento nucleotídico, o “pool” de fêmeas de *R. microplus* apresentou 98% de similaridade com *A. marginale* (número de acesso no genBank: EU677383.1; EU283845.1) e o de machos de *R.*

microplus 97% de similaridade com a amostra de *A. marginale* (número de acesso no genBank: AY998121.1). O sangue oriundo desse cervídeo também foi nPCR positivo para *A. marginale*.

Nenhuma glândula salivar foi positiva para *Ehrlichia* spp. granulocítica (Massung et al. 1998) e *Ehrlichia* spp. monocítica (Kawahara et al., 2009). Os resultados encontrados nesse subtópico encontram-se sumarizados na TAB. 3.

TABELA 3

Resultado do exame da hemolinfa, nPCR e sequenciamento nucleotídico das glândulas salivares dos carrapatos oriundos dos cervídeos de vida livre, capturados de 2007 a 2010, pertencentes ao estado de Minas Gerais

Animal/carrapato	Hemolinfa	Glândula salivar		
		nPCR <i>A. marginale</i>	nPCR <i>Babesia/Theileria</i>	Sequenciamento
MGI8/ <i>D. nitens</i>	x	-	+	<i>Theileria</i> sp.
MGI9/ <i>D. nitens</i>	x	-	F+	x
MGI9/ <i>B. microplus</i> ♂	x	-	-	x
MGI11/ <i>A. cajennense</i>	-	-	-	x
MGI12/ <i>A. cajennense</i>	-	x	x	x
MGI17/ <i>R. microplus</i> ♂	x	+	-	<i>A. marginale</i>
MGI17/ <i>R. microplus</i> ♀	x	+	-	<i>A. marginale</i>
MGI19/ <i>A. cajennense</i>	x	-	-	-
MGI22/ <i>R. microplus</i>	-	x	x	x
MGE2/ <i>D. nitens</i>	x	-	-	x

Nota: x (exame não realizado); + (detecção do hemoparasito); - (não detecção do hemoparasito); F (banda fraca no gel de agarose); ♂ (carrapatos machos); ♀ (carrapatos fêmeas).

5.1.3.3 Outros ectoparasitos encontrados

Em alguns cervídeos foram encontrados outros ectoparasitos, além de carrapatos. Nos animais MGI7 e MGI8 foram encontrados *Solenopotes binipilosus*, que são piolhos sugadores pertencentes à Ordem Anoplura. No cervídeo MGI12 foi encontrada uma pulga da espécie *Rhopalopsyllus lugubris lugubris*, e no animal MGE2, foram encontradas sarnas do gênero *Psoroptes* no pavilhão auricular (FIG. 3).

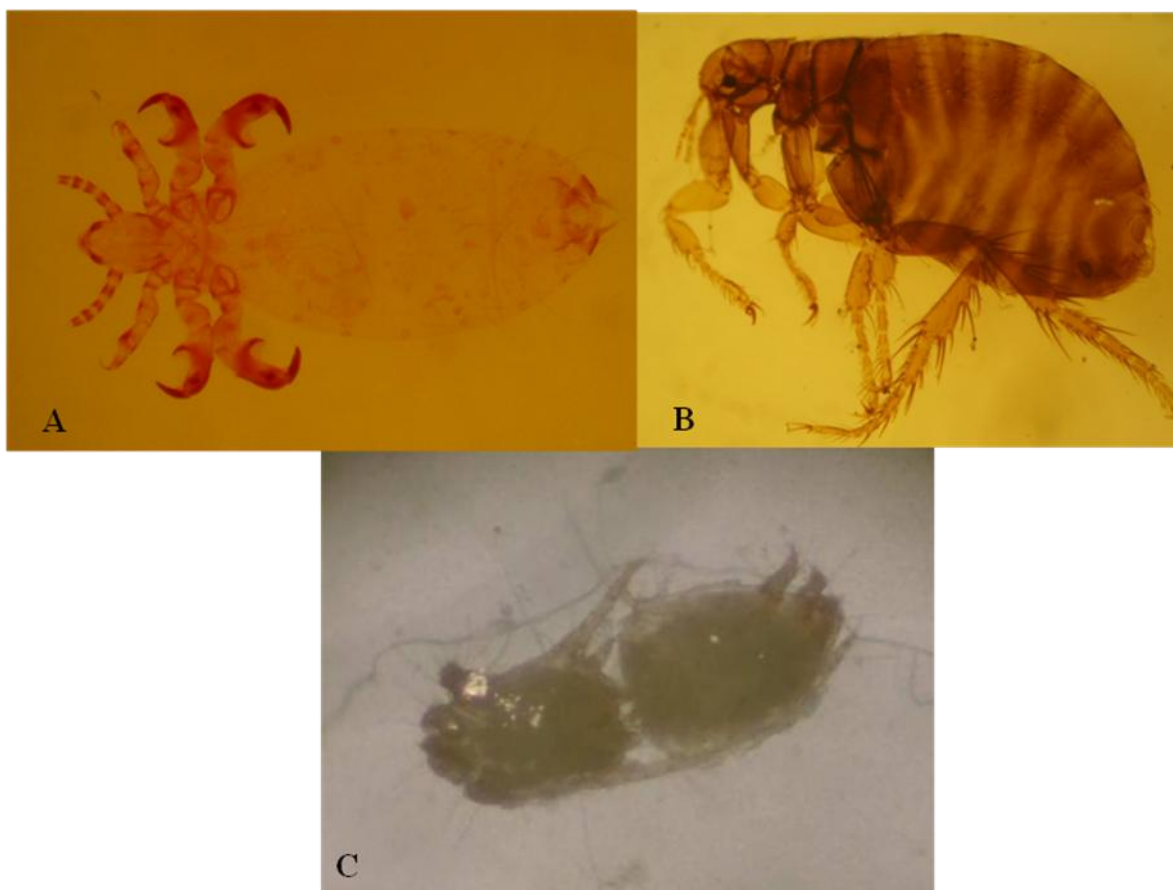


FIGURA 3: Ectoparasitos encontrados em cervídeos, pertencentes ao estado de Minas Gerais. A: piolho fêmea da espécie *S. binipilosus*; B: Pulga fêmea da espécie *R. lugubris lugubris*; C: dois espécimes de sarna copulando, sugestivo do gênero *Psoroptes*.

Em cervídeos brasileiros do gênero *Mazama* há descrição das espécies de pulgas *R. lugubris lugubris* e *R. australis tamoyus* (Linardi & Guimarães 2000). Em *Mazama* spp. brasileiros, já foram descritos o parasitismo por piolhos sugadores das espécies *Haematopinus tuberculatus*, e *Linognathus stenopsis* em cervídeos cativos em zoológico (Serra-Freire 1997). Em cervídeos do gênero *Mazama*, na Argentina, já foi descrito o parasitismo por *S. binipilosus* (Castro & Cicchino 1998). No cervídeo sul-americano “Huemul” (*Hippocamelus bisulcus*) foram encontrados piolhos da espécie *S. binipilosus* e sarnas do gênero *Psoroptes* (González-Acunã et al. 2007).

5.1.3.4 Animais necropsiados

Seis veados-catingueiros de vida livre, que vieram a óbito após a captura, foram necropsiados. Esses animais, na maioria dos casos, já chegavam debilitados ao CETAS

do IBAMA ou nas clínicas veterinárias credenciadas, principalmente por serem muito sensíveis a situações de captura e transporte, ou por serem recolhidos com fraturas de atropelamento. Os animais necropsiados foram: MGI8, MGI11, MGI12, MGI13, MGI14 e MGI19. Os resultados das análises dos esfregaços por aposição e do nPCR realizados em materiais colhidos na necropsia encontram-se na TAB. 4.

Em alguns cervídeos, a positividade nos testes moleculares foi confirmada pela observação do parasito no esfregaço por aposição. Na FIG. 4 encontra-se um exemplo de um trofozoíto observado no esfregaço por aposição do baço do espécime MGI12. Nos esfregaços de fígado dos cervídeos MGI8 e MGI11, foram observadas hemácias parasitadas por *Babesia/Theileria*, sendo que na amostra hepática do MGI8, foi confirmado o gênero *Theileria* sp. no sequenciamento nucleotídico. No esfregaço por aposição do cérebro desse animal, foram observadas hemácias parasitadas por hemoprotozoários no interior de capilares (FIG. 5). Comparado com os resultados do sequenciamento do sangue total, o animal MGI8 foi positivo para *T. cervi* e *A. marginale*, apesar de não terem sido observados *Anaplasma* nos órgãos examinados.

A observação de parasitos somente nos órgãos realça a importância do exame *post-mortem*. Baço, fígado e linfonodo são órgãos importantes no controle das hemoparasitoses, ou pela função linfóide ou pela captura e destruição das hemácias parasitadas (Schalm 1986). Na patogenia da infecção por *B. bovis* ocorre à formação de rosetas de hemácias parasitadas nos capilares cerebrais que levam a distúrbios neurológicos (Losos 1986). O parasitismo por *T. cervi* foi confirmado no sangue total dos cervídeos MGI8 e MGI19 e, além disso, no cérebro desses mesmos animais foi detectado o gene 18S rRNA para *Babesia/Theileria*. A patogenia desses hemoparasitos para os cervídeos não é totalmente conhecida, assim sendo, não se sabe se sua presença em capilares do cérebro do hospedeiro pode levar ao aparecimento de sintomas nervosos.

TABELA 4

Resultado dos esfregaços por aposição e nPCR realizado em órgãos obtidos na necropsia dos cervídeos de vida livre, pertencentes ao estado de Minas Gerais e capturados no período de 2007 a 2010

Animais	Esfregaço por aposição				nPCR				
	Baço	Fígado	Linfonodo	Cérebro	Baço	Fígado	Linfonodo	Cérebro	Sangue total
MGI8	x	+ T	x	+ T	x	+ B/T	x	+ B/T	<i>T. cervi</i> , <i>A. marginale</i>
MGI11	+A, +T	+A, +T	x	x	-	+ B/T	x	x	<i>T. cervi</i> , <i>A. marginale</i> , <i>Anaplasma</i> sp.
MGI12	+A, +T	+A, +T	x	x	-	-	x	x	<i>T. cervi</i> , <i>A. marginale</i>
MGI13	-	-	-	-	-	-	+ B/T	x	-
MGI14	-	-	-	-	+B/T, + A	+ B/T, + A	+ B/T, + A	-	<i>A. marginale</i>
MGI19	x	x	x	x	+ B/T, + A	+ B/T	+ B/T	+ B/T	<i>T. cervi</i> , <i>A. marginale</i>

Nota: x (órgão não avaliado); + (observação de hemoparasitos); - (não observação de hemoparasitos); A (*A. marginale*); T (trofozoíto); B/T (*Babesia* ou *Theileria*).

Os cervídeos MGI11 e MGI12 apresentaram esfregaço de fígado e baço positivos para *A. marginale*, mas no diagnóstico molecular, esses órgãos foram positivos somente para *T. cervi*. No cervídeo MGI13 não foram observados hemoparasitos nas análises moleculares do sangue total, apesar da positividade para *Babesia/Theileria* no linfonodo. Já o animal MGI14 foi positivo somente para *A. marginale* no sangue total e foi detectado *Babesia/Theileria* no baço, fígado e linfonodo do animal. O animal MGI19 foi positivo no nPCR de sangue total, baço, fígado e linfonodo tanto para *A. marginale* quanto *Babesia/Theileria*, confirmando a presença *T. cervi* no seqüenciamento do sangue total.

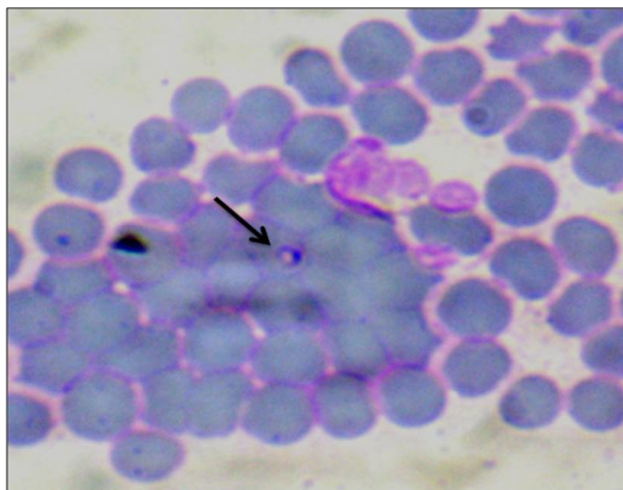


FIGURA 4: Trofozoíto de *Babesia/Theileria* observado no esfregaço por aposição de baço, do cervídeo MGI12 (Corante: Romanowsky; aumento 100X).

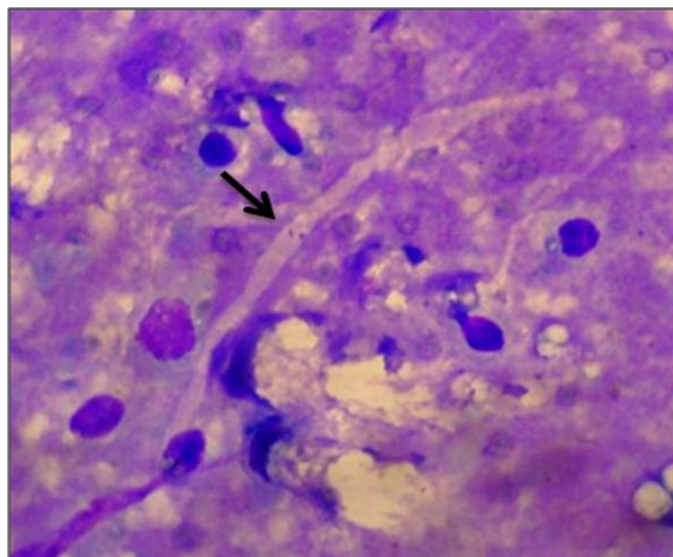


FIGURA 5: Hemácias parasitadas por hemoprotozoários *Babesia/Theileria* no interior de capilares cerebrais do cervídeo MGI8 (Corante: Romanowsky; aumento 100X).

Além do gene *msp4* para a identificação de *A. marginale* e do gene 18S rRNA para a identificação de *Babesia/Theileria*, foram utilizados os iniciadores com o alvo 16S rRNA para a procura de *Ehrlichia* spp. granulocítica (Massung et al. 1998) e *Ehrlichia* spp. monocítica (Kawahara et al. 2009). Todos os órgãos analisados foram negativos para a presença desses micro-organismos.

5.1.3.5 Infecção por *Trypanosoma* spp.

Em relação ao *T. evansi*, dos 29 cervídeos de Minas Gerais submetidos ao semi nPCR, sete (24,1%) apresentaram bandas de tamanho similar à banda do controle positivo (MGI3, MGI7, MGI12, MGE1, MGE2, MGZBH1 e MGZBH2) (FIG. 6). Porém, somente o animal MGZBH1 apresentou sequenciamento nucleotídico homólogo ao *Trypanosoma evansi evansi* isolado de dromedário (98% de identidade).

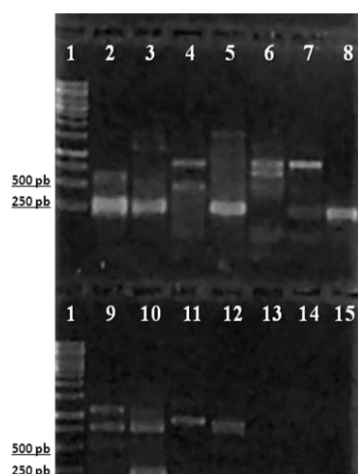


FIGURA 6: Análise dos produtos da semi-nPCR em gel de agarose 1% corado com Gel Red. Primers: 1º reação: Te1F/Te1R; 2º reação: Te2F/Te1R. 1- Peso molecular (banda alvo: 219 pb); 2- Controle positivo *T. evansi*; 3 a 6 - espécimes de *O. bezoarticus*, pertencentes ao estado de MS; 7-13 espécimes de *M. gouazoubira*, pertencentes ao estado de MG, sendo: 7- MGE1; 8- MGE2; 9- MGZBH2; 10- MGZBH1; 11- BDZBH1; 12- BDZBH2; 13- BDZBH3; 14- Branco da 1º reação; 15- branco da 2º reação (As bandas com peso molecular superior a 219 pb são inespecíficas).

Nenhum animal apresentou banda compatível com *T. vivax*, cabendo ressaltar que a única combinação de iniciadores efetiva foi a que era representada por somente uma reação de PCR, o que diminui a sensibilidade do teste.

5.1.3.6 Coinfecção por hemoparasitos

A coinfecção por hemoparasitos ocorreu em 19 (65,5%) dos 29 cervídeos do estado de Minas Gerais (TAB. 5). Esse fato foi observado, inclusive, entre membros da mesma família Anaplasmataceae, indicando que a presença de um micro-organismo dessa família não determina a proteção contra a infecção de outros membros Anaplasmataceae.

Em relação aos hemoprotozoários, não foi observada a coinfeção entre *Babesia/Theileria*. A utilização dos mesmos iniciadores para todos os membros dessa família pode ter contribuído para esse resultado. Porém, quando acontece a detecção de dois parasitos com sequências diferenciadas, pode ocorrer sobreposição dos picos formados pelos pares de bases na leitura do sequenciador, podendo ocasionar erro na leitura pelo MegaBace. Esse fato não foi observado em nenhuma leitura do sequenciador. Além disso, utilizando o programa ClustalW2 para alinhar sequências com o alvo 18S rRNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *T. cervi*, é possível observar vários locais não homólogos nas sequências, indicando que elas são específicas (FIG. 7).

TABELA 5

Resultado da presença de hemoparasitos encontrados nas amostras dos cervídeos, pertencentes ao estado de Minas Gerais. Os animais destacados em negrito são aqueles em que a coinfeção foi detectada

Identificação	<i>E. chaffeensis</i>	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>A. bovis</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>T. cervi</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	<i>T. evansi</i>
MGI1					+				
MGI2						+			
MGI3		+		+		+			+
MGI4				+					
MGI5				+		+			
MGI6				+		+			
MGI7				+					+
MGI8				+		+			
MGI9					+				
MGI10				+					
MGI11		+		+		+			
MGI12				+		+			+
MGI13									
MGI14				+					
MGI15	+			+		+			
MGI16		+		+		+			
MGI17		+		+		+			
MGI18				+		+			
MGI19				+		+			
MGI20				+		+			
MGI21		+				+			
MGE1				+		+			+
MGE2				+			+		+
MGZBH1				+		+			+
MGZBH2									+
BDZBH1				+					
BDZBH2				+					
BDZBH3				+		+			
BDZBH4			+	+					

```

Theileriacervigb|HQ184412.1|      -CTAATTG-TAGGGCTAATACATGTTGCGAGGCTTCGGGCGGCGTTTATT 82
B.bovis                          TTTGCTTGGCCACCATCGGTACCAAGTGATACAOCTC---ACAGCCCTGATG 96
                                *  ***  *      ***  **  *  ***  *  **  *  **

E.bigeminagb|HQ840960.1|      AGTTC-----CTTAACCACTT----TTTCTGGTGATTGATAATAAACTTG 236
Theileriacervigb|HQ184412.1|  AGAOCCTAAAACCACCAACCGCTTGCCTGCGGTGTTGCGGTGATTGATAATAAACTTG 132
B.bovis                          ACATT-----AAGTCGAGTGAACGTAGTTAGTACTCAGAACCA--TCA 137
                                *      *  *  *  *  **  ****  **  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      CGAATCGC-----TTTTGCGA-TGTTCCATTCAAGTTTCTGCCCATCAG 280
Theileriacervigb|HQ184412.1|  CGAATCGCGGCTCTGCTGCGA-TGTGTCAATCAAGTTTCTGACCTATCAG 181
B.bovis                          CAGAGCAC-----TGATGTGAACGACCCCTCCCGGATG-AACCGATTGA 181
                                *  *  *  *  *  *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  **  **

E.bigeminagb|HQ840960.1|      CTT---GACGGTAGGGTATTGGC-CTACCGAGGCAGCAACGGGTAAACGGG 326
Theileriacervigb|HQ184412.1|  CTTTG-GACGGTAGGGTATTGGC-CTACCGGGCAGCGACGGGTAAACGGG 229
B.bovis                          CCCCTTGGTGGTCCCAATAAGTACTACCGAGCAGCAA---GTATT--- 225
                                *  *  ***  **  *  *****  *****  *  ***

E.bigeminagb|HQ840960.1|      GAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCCAT- 375
Theileriacervigb|HQ184412.1|  GAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCCAT- 278
B.bovis                          ---CCAAAGT-CGGTTTCAAAGAAGGATT----GAAACGGAAACTAGAAA 267
                                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      CTAAGGAAGGCAGCA-GGCGCG-----CAAATTACCCA-ATCCTGACAC 417
Theileriacervigb|HQ184412.1|  CTAAGGAAGGCAGCA-GGCGCG-----CAAATTACCCA-ATCCTGACAC 320
B.bovis                          CTGATGAGGAACGTATGGCGAGGACCTTTAACATATTCGCACCCATGCC 317
                                **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAAT-ACAGGGCTTTC-GTCTTGTA-A 464
Theileriacervigb|HQ184412.1|  AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAAT-ACGGGGCTTAAAGTCTTGTA-A 368
B.bovis                          AAGGAGCCATGATCA---ATCCCGATCGCAAGGAT----GCCCGGACA 360
                                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      TTGGAATGATGG-TGATGTACAACCTCA-CCAGAGTACCAATTGGAGGGC 512
Theileriacervigb|HQ184412.1|  TTGGAATGATGG-GAATCTA-AACTCTTCCAGATATCAATTGGAGGGC 416
B.bovis                          TATCCCTGATTGCGGACATA-AAC-----AAAAACATTAACATATGAC 403
                                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      AAGTCTGGTGC--CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT 560
Theileriacervigb|HQ184412.1|  AAGTCTGGTGC--CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT 464
B.bovis                          GAAACTAGAGAAACAGAAACTTGAGGAATCCCGGAAAAAGAGGAAACAG 453
                                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

E.bigeminagb|HQ840960.1|      TAAACTTGTTCAGT-TAAAAAGCTCGTAGTTGTAATTCAGCCTCGC-GT 608
Theileriacervigb|HQ184412.1|  TAAAAATGTTCAGT-TAAAAAGCTCGTAGTTGTAATTCGCTGCATTGC 513
B.bovis                          TGAACACAGTGCCTCCTATGCCACTCAAGGTGG-----CTACTACATCGA 498
                                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

FIGURA 7: Alinhamento das seqüências 18S rRNA de *B. bigemina* gb|HQ840960.1|, *B. bovis* gi|156089128| e *T. cervi* gb|HQ184412.1|, através do programa ClustalW2, ilustrando os locais não homólogos entre essas espécies de hemoparasitos. Os locais não homólogos não possuem *

5.1.3.7 Inoculação de ruminantes domésticos com amostras de *A. marginale* oriundas de cervídeos

Amostras de sangue criopreservadas em nitrogênio líquido do veado-catingueiro (MGI5), positivo para *A. marginale* e para *T. cervi*, foram inoculadas por via

intravenosa em um bezerro esplenectomizado (de raça holandesa com idade entre 10 e 20 dias), mantido no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG (bezerro 1). Antes da inoculação, uma amostra de sangue do animal foi colhida e apresentou-se negativa no nPCR para *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp.

Após 30 dias da inoculação, foram detectadas hemácias com corpúsculos de *A. marginale* no esfregaço de sangue periférico. No 36º dia pós inoculação (DPI), foi realizado o nPCR e o animal apresentou-se positivo para *Anaplasma* e negativo para *T. cervi*, indicando ausência da infecção por *T. cervi*. Após sequenciamento nucleotídico, foi confirmada a infecção por *A. marginale*. O bezerro não apresentou febre nem queda de hematócrito (variou de 37 a 40%) durante o período de acompanhamento (superior a 80 dias). No 65 DPI o bezerro 1 apresentou parasitemia por *A. marginale* de 2,8%, medida por citometria de fluxo, e uma alíquota de sangue foi coletada de modo estéril e criopreservada.

No 81 DPI do bezerro 1, uma bolsa de sangue (500 mL) foi coletada e transferida para outro bezerro esplenectomizado (bezerro 2). Após três DPI, o bezerro 2 apresentou parasitemia de *A. marginale* de 1,5% na citometria de fluxo. Esfregaços sanguíneos realizados no 5º DPI detectaram inclusões intraeritrocíticas com parasitemia de 1,5%. A parasitemia máxima foi de 2,5%, detectada dez DPI. O bezerro 2 não apresentou febre e nem queda do hematócrito (variou de 37 a 39%). Esse resultado sugere que a amostra de *A. marginale* oriunda do veado-catingueiro MGI5 apresentou baixa virulência para bovinos.

Os bezerros foram desafiados com a amostra de *A. marginale* UFMG2 de alta virulência para a verificação da proteção pela amostra oriunda do veado-catingueiro MGI5. O bezerro 1 foi desafiado 148 DPI e o bezerro 2 aos 63 DPI. Em ambos os bezerros, foram inoculados intravenosamente 1,8 mL de cultivo de células IDE8 contendo aproximadamente $3,6 \times 10^7$ corpúsculos de *A. marginale*, de acordo com Bastos et al. (2010). Vinte DPI da amostra UFMG2, a infecção dos animais foi acompanhada por aferição da temperatura, esfregaço sanguíneo e hematócrito. Os dois bezerros apresentaram febre e queda do V.G., o que indica que os animais não desenvolveram proteção contra uma amostra de alta virulência de *A. marginale*. No dia 25 após o desafio, os animais foram tratados com enrofloxacina por via IM na dose de 7,5 mg/Kg.

O bezerro 1 veio a óbito no dia seguinte ao tratamento. É importante salientar que esses animais foram esplenectomizados e o baço é um órgão de grande importância na captura e destruição de hemácias parasitadas, sendo esse um possível motivo de os bezerros não terem desenvolvido uma resposta imune efetiva contra a amostra desafio.

Um carneiro adulto esplenectomizado foi inoculado com uma amostra sanguínea do MGI8, juntamente com o cultivo de *A. marginale* oriundo de um dos bezerros inoculados com a amostra MGI5, visando à passagem da amostra em outro pequeno ruminante de hábito alimentar seletivo. Antes da inoculação, o sangue do carneiro foi colhido e testado em nPCR para o gene *msp4* de *A. marginale* e o resultado foi negativo. Trinta DPI foram observadas hemácias parasitadas no esfregaço sanguíneo. Os esfregaços continuaram positivos por 20 dias após a primeira detecção. A temperatura retal se manteve em condições normais, variando de 38,3°C a 39,1°C. O volume globular mínimo encontrado no animal foi de 23% e o máximo de 30%. A parasitemia máxima detectada por citometria de fluxo foi de 7,11% e ocorreu nos 27 DPI. Nos 28 DPI, alíquotas de sangue do carneiro foram colhidas assepticamente e congeladas em nitrogênio líquido, usando DMSO como crioprotetor. Em relação aos resultados obtidos na nPCR, o animal foi positivo para *A. marginale* oito dias após a inoculação e até 48 dias após a inoculação o animal ainda permaneceu positivo. Nos 59 e 64 DPI foram colhidas amostras de sangue sem anticoagulante para a obtenção de soro e realização de RIFI para detecção de anticorpos anti-*A. marginale*. O animal reagiu na titulação até 1:240 nos dias 59 e 64, indicando que o carneiro desenvolveu resposta imunológica humoral contra a infecção.

5.1.3.8 Isolamento e cultivo de *A. marginale* em células IDE8 infectadas com amostra de *A. marginale* oriunda de cervídeo

A alíquota criopreservada de sangue do bezerro 1 com 2,8% de parasitemia foi utilizada para a infecção de células IDE8 livres. A partir da quarta passagem, cerca de 48 dias após a infecção da primeira garrafa, foram observados alguns corpúsculos nas células IDE8 infectadas sugestivos de *A. marginale*. Nos esfregaços celulares, foi observado o desenvolvimento de vacúolos parasitóforos contendo material amorfo com poucos corpúsculos iniciais, não apresentando colônias típicas de *A. marginale*. As células apresentavam núcleo periférico e vacúolos, porém esses vacúolos não se apresentavam

repletos de corpúsculos bem definidos, e sim de corpúsculos de diferentes tamanhos e formas na análise de microscopia óptica em lâminas de esfregaços celulares (FIG. 10).

Alíquotas de células IDE8 foram submetidas a estudos morfológicos ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão. No material processado da passagem 16 foram observadas células IDE8 com corpúsculos iniciais íntegros no interior do vacúolo (FIG. 8, seta A). Entretanto, nas mesmas células foram observados vacúolos parasitófagos com corpúsculos em degeneração (FIG. 8, seta B). A partir da passagem 29 a reação de nPCR foi negativa e não foram mais observados nos esfregaços celulares estruturas sugestivas de *A. marginale*.

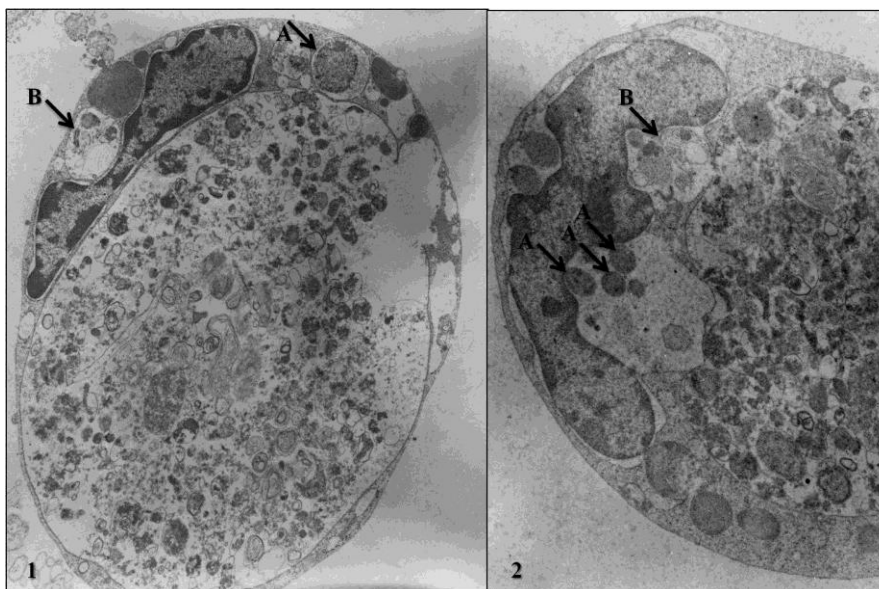


FIGURA 8.1 e 8.2: Eletromicrografia de células IDE8 inoculadas com *A. marginale* de *M. gouazoubira* na 16ª passagem. **A:** As setas destacam vacúolos contendo estruturas sugestivas de corpúsculos iniciais, sendo que na fig. 8.1 a membrana do vacúolo encontra-se preservada. **B:** As setas destacam vacúolos contendo estruturas sugestivas de corpúsculos iniciais não íntegros, em processo de degeneração.

Foi realizada a extração de DNA das células IDE8 infectadas seguida de reações de nPCR (FIG. 9) e sequenciamento nucleotídico para o gene *msp4*. Alíquotas das passagens quatro, cinco e 11 apresentaram reações positivas e o sequenciamento demonstrou 99% de identidade com amostras de *A. marginale*, confirmando a presença do micro-organismo no cultivo celular.

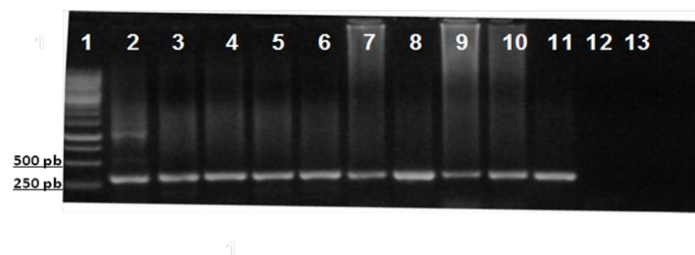


FIGURA 9: Análise dos produtos da nested PCR em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio. 1- Peso molecular (banda alvo 294pb); 2- Controle positivo *A. marginale*; 3 a 9- espécimes de *Mazama gouzoubira* recolhidos pelo IBAMA-MG; 10 e 11- Cultivo de *A.marginale* oriundo de cervídeo em célula IDE8 (4^o e 5^o passagens); 12- Branco da 1^oreação; 13- branco da 2^o reação.

Para a observação de *A. marginale* nas culturas de células IDE8, essas células foram utilizadas como antígeno de RIFI e testados soros de bovinos sabidamente positivos. As lâminas foram confeccionadas com células obtidas na passagem 25, com 15 dias de infecção. Foi observada a fluorescência dos corpúsculos no interior do citoplasma das células IDE8 infectadas com soros na diluição de 1:40 (FIG. 11).

Esses dados confirmam que o isolado de *A. marginale* oriundo de veado-catingueiro mantiveram, mas não estabeleceram adequadamente em células IDE8. Na literatura, há descrição de casos de isolados de *A. marginale* e *A. centrale* que não estabelecem adequadamente em cultivo *in vitro*.

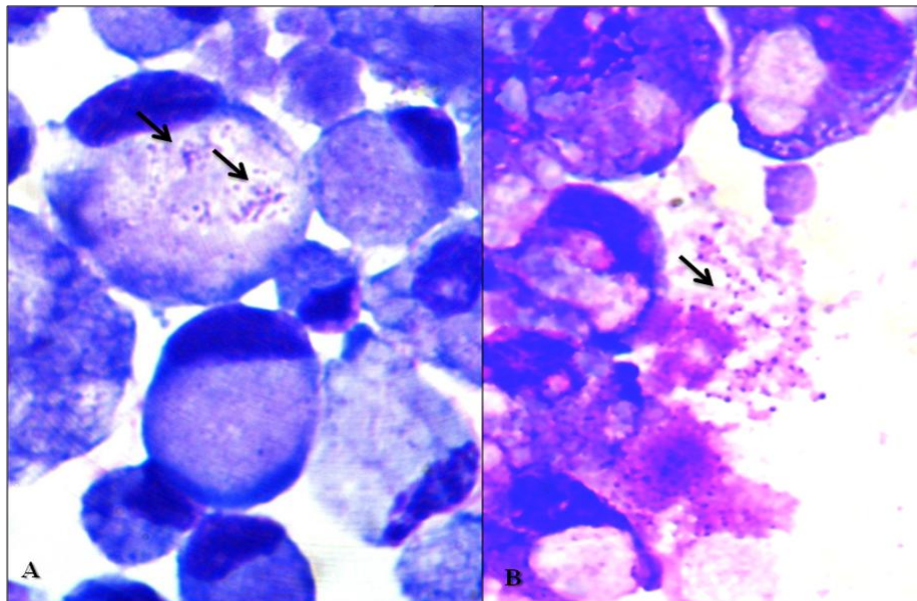


FIGURA 10A e 10B: Células IDE8 do cultivo *A. marginale* de *M. gouazoubira* na 22ª passagem. Fig. A: Observam-se vacúolos com a presença de poucos corpúsculos iniciais (setas). Fig B: Corpúsculos iniciais livres e bem definidos (Coradas com Romanowsky, x100).

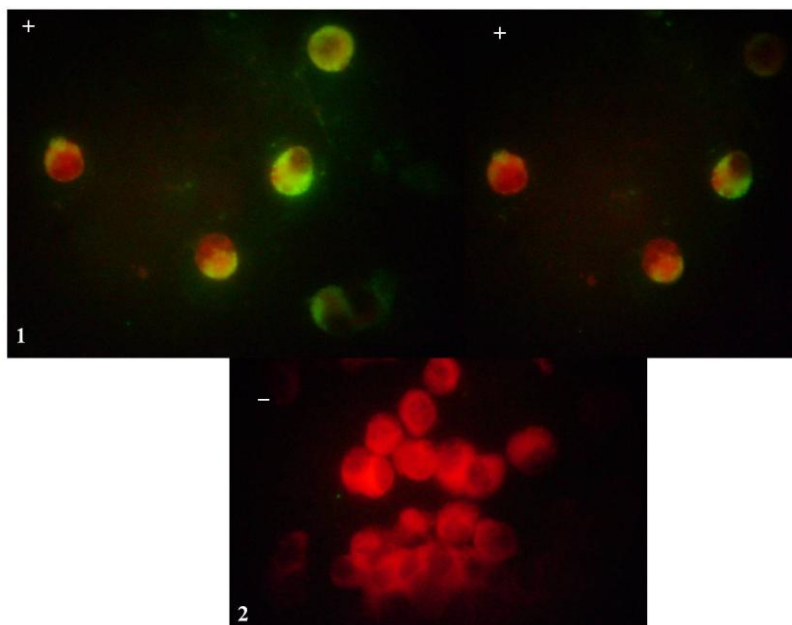


FIGURA 11: Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com células IDE8 infectadas com *A. marginale* oriundo de cervídeo, na 25ª passagem. Acima, a reação positiva com fluorescência esverdeada dos corpúsculos no interior das células IDE8 e abaixo a reação negativa (x100).

5.2 Resultados do material de *O. bezoarticus* oriundos de Mato Grosso de Sul

Foram analisadas 60 alíquotas de papa de hemácias de espécimes de veado-campeiro de vida livre (*O. bezoarticus*) procedentes do estado de Mato Grosso do Sul. Por isso, só foi possível a detecção parasitos de hemácias, ou seja, protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria* e bactérias da espécie *Anaplasma marginale*, ou parasitos extracelulares sanguíneos, como os do gênero *Trypanosoma*.

Os resultados obtidos com os iniciadores cujo alvo foi o gene *msp4* de *Anaplasma* mostraram 29 (48,33%) dos animais positivos, sendo que duas amostras não obtiveram sucesso no sequenciamento. Desses vinte e nove animais, nove (31,0%) eram machos adultos, nove (31,0%) eram fêmeas adultas, cinco (17,2%) eram fêmeas filhotes, quatro eram machos filhotes (13,8%) e dois não possuíam informações sobre sexo ou idade (6,9%) (TAB.6). Após o sequenciamento, o alinhamento e a comparação com amostras depositadas no GenBank, com o auxílio do programa BLASTN, foi verificado que todas as amostras positivas apresentaram entre 91 a 99% de similaridade com amostras de *A. marginale* depositadas no GenBank.

Os veados-campeiro do pantanal mostraram uma menor percentagem (48,3%) de positividade para *A. marginale* se comparados aos animais oriundos de Minas Gerais (78,6%). Inúmeras razões podem ter influenciado esse resultado, uma vez que são espécies diferentes de cervídeos. Uma possibilidade é que *M. gouazoubira* seja mais susceptível à infecção do que *O. bezoarticus*. A outra está relacionada ao tipo de habitat, que é distinto entre essas duas espécies. A proximidade de pastos pode resultar em uma maior convivência dos cervídeos com o bovino doméstico, que comumente estão parasitados por *A. marginale*. Picoloto et al. (2010) testaram a positividade de populações de veado-campeiro e de bovino doméstico para *A. marginale* também na região pantaneira, através de PCR em tempo real (RT-PCR), e observaram uma positividade de 16,3% nos veados.

Em relação ao nPCR utilizando os iniciadores para a região 18S rRNA de *Babesia* e *Theileria*, foi observada uma positividade em 23 (38,3%) dos animais, sendo que seis amostras não obtiveram sucesso no sequenciamento. Após o sequenciamento, foram realizados o alinhamento e a comparação com amostras depositadas no GenBank, com o

auxílio do programa BLASTN. Das 23 amostras, foi verificado que 12 (52,2%) obtiveram similaridade com *Theileria cervi* (90 a 100% de similaridade com sequências depositadas no GenBank, sendo que três obtiveram 100% de similaridade com a amostra do veado-catingueiro MGI12) (FIG. 12); três (13%) com *Babesia bovis* (87 a 100% de similaridade com sequências depositadas no GenBank, todas advindas de cervo-da-cauda-branca); e duas (8,7%) com *B. bigemina* (98% de similaridade com uma sequência isolada de bovino e depositada no GenBank). Dos doze animais positivos para *T. cervi*, seis (50%) eram machos adultos, dois (16,6%) eram fêmeas adultas, dois (16,6%) eram fêmeas filhotes, um (8,3%) era macho filhote e um animal (8,3%) não continha informações sobre sexo e idade. Dos três animais positivos para *B. bovis*, um era macho adulto (33,3%), um era fêmea adulta (33,3%) e um macho filhote (33,3%). Já dos dois animais positivos para *B. bigemina*, um era macho (50%) e outro fêmea adulta (50%) (TAB. 6).

Testes sorológicos e moleculares em veados-campeiros da região pantaneira mostraram alta prevalência de *Babesia* sp. nesses ruminantes (Villas-Boas 2007). Machado & Müller (1996) verificaram prevalência de 8,3% de *B. bovis* e de 29,7% de *B. bigemina* em veados-campeiros de vida livre no Parque Nacional das Emas, no estado de Goiás.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

MGI1 2      GGTCCA GACAGAGGAAGGAATGACAGATTGATAGCTCTTTCATGATTC TTTGGGTGGTGG 60
OBMS 70     GGTCCA GACAGAGGAAGGAATGACAGATTGATAGCTCTTTCATGATTC TTTGGGTGGTGG 60
OBMS 38     GGTCCA GACAGAGGAAGGAATGACAGATTGATAGCTCTTTCATGATTC TTTGGGTGGTGG 60
OBMS 39     GGTCCA GACAGAGGAAGGAATGACAGATTGATAGCTCTTTCATGATTC TTTGGGTGGTGG 60
*****

MGI1 2      TGCATG GCCGTTCTTAGT TGGTGGAGT GATTTGTCTGGT TAAATTC CGT TAA CGAACGAGA 120
OBMS 70     TGCATG GCCGTTCTTAGT TGGTGGAGT GATTTGTCTGGT TAAATTC CGT TAA CGAACGAGA 120
OBMS 38     TGCATG GCCGTTCTTAGT TGGTGGAGT GATTTGTCTGGT TAAATTC CGT TAA CGAACGAGA 120
OBMS 39     TGCATG GCCGTTCTTAGT TGGTGGAGT GATTTGTCTGGT TAAATTC CGT TAA CGAACGAGA 120
*****

MGI1 2      CCTTAA CCTGCTAAA TAGGGTACGGGAATAGGCTTCGGCTGTCCC GTGATCGCTTCTTAG 180
OBMS 70     CCTTAA CCTGCTAAA TAGGGTACGGGAATAGGCTTCGGCTGTCCC GTGATCGCTTCTTAG 180
OBMS 38     CCTTAA CCTGCTAAA TAGGGTACGGGAATAGGCTTCGGCTGTCCC GTGATCGCTTCTTAG 180
OBMS 39     CCTTAA CCTGCTAAA TAGGGTACGGGAATAGGCTTCGGCTGTCCC GTGATCGCTTCTTAG 180
*****

MGI1 2      AGGGACTTTGCGGTTATAAATCGCAAGGAA GTTTAAAGGC AATAACAGG TCTGTGATGCC 240
OBMS 70     AGGGACTTTGCGGTTATAAATCGCAAGGAA GTTTAAAGGC AATAACAGG TCTGTGATGCC 240
OBMS 38     AGGGACTTTGCGGTTATAAATCGCAAGGAA GTTTAAAGGC AATAACAGG TCTGTGATGCC 240
OBMS 39     AGGGACTTTGCGGTTATAAATCGCAAGGAA GTTTAAAGGC AATAACAGG TCTGTGATGCC 240
*****

MGI1 2      TTAGAT GTCCTGGCTGCA CGCGCGCTACA CTGATGCGTTCATCGAGT TTA TCC TTG GCC 300
OBMS 70     TTAGAT GTCCTGGCTGCA CGCGCGCTACA CTGATGCGTTCATCGAGT TTA TCC TTG GCC 300
OBMS 38     TTAGAT GTCCTGGCTGCA CGCGCGCTACA CTGATGCGTTCATCGAGT TTA TCC TTG GCC 300
OBMS 39     TTAGAT GTCCTGGCTGCA CGCGCGCTACA CTGATGCGTTCATCGAGT TTA TCC TTG GCC 300
*****

MGI1 2      GAGAGG CCTGGTAA TCTTTAGTACGCATC GTGATGGGATCGAT TATGCAAT TAT TAA 360
OBMS 70     GAGAGG CCTGGTAA TCTTTAGTACGCATC GTGATGGGATCGAT TATGCAAT TAT TAA 360
OBMS 38     GAGAGG CCTGGTAA TCTTTAGTACGCATC GTGATGGGATCGAT TATGCAAT TAT TAA 360
OBMS 39     GAGAGG CCTGGTAA TCTTTAGTACGCATC GTGATGGGATCGAT TATGCAAT TAT TAA 360
*****

MGI1 2      TCGTGA ACGAGGAATGCC TAGTATGCGCAA GTCATCAGCTTG TGCAATTACGT CCC TGC 420
OBMS 70     TCGTGA ACGAGGAATGCC TAGTATGCGCAA GTCATCAGCTTG TGCAATTACGT CCC TGC 420
OBMS 38     TCGTGA ACGAGGAATGCC TAGTATGCGCAA GTCATCAGCTTG TGCAATTACGT CCC TGC 420
OBMS 39     TCGTGA ACGAGGAATGCC TAGTATGCGCAA GTCATCAGCTTG TGCAATTACGT CCC TGC 420
*****

MGI1 2      CC 422
OBMS 70     CC 422
OBMS 38     CC 422
OBMS 39     CC 422
**

```

FIGURA 12: Alinhamento das seqüências 18S rRNA de *T. cervi*, através do programa ClustalW2, comparando as amostras oriundas de veados-campeiros do MS e a amostra de veado-catingueiro MGI12 de MG. A homologia é representada por * e observada em todos os nucleotídeos.

Parasitas da espécie *Trypanosoma evansi* foram encontrados em 11 (18,3%) dos veados-campeiros. Porém, apenas duas amostras obtiveram sucesso no sequenciamento (87 e 94% de similaridade com amostras depositadas no GenBank). Das onze amostras positivas, três eram machos adultos (27,3%), três fêmeas adultas (27,3%), dois machos filhotes (18,2%), duas fêmeas filhotes (18,2%) e duas amostras (18,2%) não apresentavam os dados do animal (TAB.6). Na região de Nhecolândia, no Pantanal brasileiro, os veados-campeiros estudados apresentaram positividade de 68,9% (51/74)

para *T. evansi* e de 21,6% (16/74) para *T. vivax*, não havendo diferença de parasitismo entre sexo e idade dos animais (Herrera et al. 2010).

TABELA 6

Frequência da infecção por hemoparasitos em veados-campeiros pertencentes ao estado de Mato Grosso do Sul e capturados no ano de 2006, parasitados por hemoparasitos e divididos conforme sexo e faixa etária do animal

	Total de <i>O. bezoarticus</i>	Macho adulto	Fêmea adulta	Macho filhote	Fêmea filhote	Sem dados
nPCR	23/60	X	X	X	X	X
RIB + BabRum	(38,3%)					
<i>T. cervi</i>	12/23 (52,2%)	6/12 (50%)	2/12 (16,6%)	1/12 (8,6%)	2/12 (16,6%)	1/12 (8,6%)
<i>B. bigemina</i>	2/23 (8,7%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2	0/2	0/2
<i>B. bovis</i>	3/23 (13%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	0/3	0/3
nPCR	29/60	9/29	9/29	4/29	5/29	2/29
MSP4 + Anap	(48,33%)	(31%)	(31%)	(13,8%)	(17,2%)	(6,9%)
<i>A. marginale</i>						
Semi-nPCR	11/60	3/11	3/11	2/11	2/11	2/11
Te1+Te2	(18,3%)	(27,3%)	(27,3%)	(18,2%)	(18,2%)	(18,2%)
<i>T. evansi</i>						

Nota: x (dados não analisados).

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Foram analisadas amostras sanguíneas de 89 cervídeos, sendo 29 amostras de animais pertencentes ao estado de MG e 60 amostras de MS. As amostras de MS foram de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) de vida livre. As amostras sanguíneas dos animais de Minas Gerais originaram-se de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) e cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Foi observada alta percentagem de animais infectados com alguma espécie de hemoparasitos. Dos animais pertencentes a MG, todos estavam infectados por algum tipo de hemoparasito, sendo que no animal MG113 o parasitismo por *Babesia/Theileria* só foi detectado na amostra de baço, e o animal MGZBH2 apresentou uma banda compatível com *T. evansi*, porém sem sucesso no sequenciamento nucleotídico. Dos veados-campeiros do MS, 23,33% (14/60) dos animais não se mostraram infectados por nenhum hemoparasito. Porém, vale ressaltar que das amostras de veado-campeiro, a extração de DNA foi realizada apenas da papa de hemácias, que é menos efetiva por ser possível apenas a procura de parasitos intraeritrocíticos ou extracelulares. Esse fato pode ter influenciado na menor ocorrência da infecção observada nesses animais. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os cervídeos brasileiros podem carrear várias espécies de hemoparasitos, inclusive filogeneticamente relacionados.

Até onde foi possível pesquisar na literatura, o presente trabalho envolve os primeiros registros de parasitos do gênero *Theileria* em cervídeos sul-americanos e foi observada uma alta percentagem de animais infectados. *Theileria cervi* é um parasito comumente relatado em cervos da América do Norte, e geralmente possuem baixa patogenicidade (Schaeffler 1962; Laird et al. 1988; Yasbly et al. 2005). Os resultados obtidos sugerem que, em geral, os cervídeos apresentam maior taxa de infecção por esse protozoário do que pelo gênero *Babesia*. Foi constatado, também, que o bezerro inoculado com *T. cervi* não se infectou, o que sugere que esse parasito não tem importância econômica na pecuária, como também foi observado por Kreier et al. (1962). Entretanto em cervídeos, em casos de alta parasitemia e em situações que acarretam imunossupressão, os animais podem desenvolver sintomas clínicos (Kocan & Kocan 1991; Fowler 1993; Yabsley et al. 2005). A detecção de *B. bovis* nos animais pesquisados foi baixa em MG (3,4%) e em MS (5%). Esse fato é importante, já que essa espécie de hemoparasito pode ser

bastante patogênica para *M. gouazoubira* (Duarte 2006) e também para os bovinos (Losos 1986).

Ramos et al. (2010) fizeram um levantamento, no estado do Texas (U.S.A), da ocorrência de *B. bovis* e outras espécies de *Babesia* e *Theileria* em cervos-da-cauda-branca através de RIFI e PCR, para avaliar o papel desses animais como reservatórios desses hemoparasitos. Nessa área, os bovinos são constantemente monitorados para evitar o reestabelecimento desses hemoparasitos na região. Na sorologia foram detectados cervos positivos para *B. bovis* e na PCR foi detectada baixa frequência (4% a 16%) de cervos positivos para *B. bovis*. Os autores concluíram que a possibilidade mais provável é que o parasito *B. bovis* “like” isolado de veados não é infeccioso para o bovino, já que nessa região a frequência de *B. bovis* nos bovinos é baixa. Para confirmar essa hipótese, seria necessária a inoculação de uma amostra de *B. bovis* oriunda de veados em um bezerro esplenectomizado e a observação da patogenia dessa amostra para o bovino.

Normalmente, o diagnóstico de infecção de hemoparasitos é realizado através de esfregaços sanguíneos. Devido à ocorrência de baixas parasitemias nos animais portadores de *T. cervi*, o exame direto apresenta baixa sensibilidade, além de dificultar o diagnóstico diferencial com *B. bovis*. No esfregaço sanguíneo, algumas características morfológicas dos parasitos ajudam na distinção das espécies. Na *Theileria*, os trofozoítos possuem formato circular e a cromatina possui o formato de meia-lua, que cobre um lado do parasito e se estende por toda a circunferência, enquanto a cromatina dos trofozoítos de *Babesia* geralmente se localiza em apenas um dos lados da circunferência (Kreier 1977). Entretanto, em área endêmica para ambos os parasitos, essas diferenças morfológicas não são suficientes para realizar um diagnóstico seguro. Os animais que apresentaram esfregaço positivo para *T. cervi* também foram positivos no nPCR, indicando que esse diagnóstico molecular apresenta alta sensibilidade e deve ser implantado na rotina de exames de sangue de cervídeos na America Latina. O estabelecimento dessa metodologia poderá fornecer, em estudos futuros, um quadro mais preciso da presença e distribuição desses hemoparasitos em animais silvestres no Brasil e outras localidades.

A detecção de *A. marginale* foi alta nos cervídeos examinados, sendo de 79,3% em MG e 48,33% no MS. A anaplasmose bovina apresenta grande importância econômica para a pecuária brasileira e o presente estudo reforça a presença desse micro-organismo em ruminantes selvagens brasileiros. Porém, pouco se sabe sobre a consequência desse parasitismo para os cervídeos. O diagnóstico utilizando nested PCR foi mais efetivo do que de alguns estudos anteriores que utilizaram PCR padrão ou RT-PCR (Machado et al. 2006a; Picoloto et al. 2010). Além disso, iniciadores utilizando o gene *mSP4* detectaram mais cervídeos positivos do que as reações utilizando o gene *mSP1a*. Esses fatos indicam que o uso de duas reações de PCR (nPCR) e do gene *mSP4* como alvo mostram-se mais efetivos para detecção de *A. marginale* em baixas parasitemias.

Em relação aos outros membros da Família Anaplasmataceae encontrados no presente estudo, foi possível observar que a ocorrência foi inferior aos de *Theileria* spp. e *A. marginale*. Porém, devem ser ressaltado que algumas espécies tem potencial zoonótico, como *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*. Outros *Anaplasma* spp. detectados em cervídeos brasileiros e norte-americanos (Sacchi 2009; Munderloh et al. 2003) também apresentaram esse mesmo perfil, podendo indicar que a espécie presente em cervídeos pode ser uma outra espécie ou subespécie de *Anaplasma*, que possui maior afinidade por infectar esses ruminantes selvagens.

Parasitas do gênero *Trypanosoma* foram encontrados em menor frequência, sendo que *T. vivax* não foi diagnosticado nos cervídeos do presente estudo. Em Minas Gerais, o único animal positivo para *T. evansi* com sucesso no sequenciamento era um animal de cativeiro, originário do zoológico de Brasília, que está localizado em uma região endêmica para esse parasito. O outro veado-catingueiro pertencente à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte também apresentou banda compatível com *T. evansi* e esse fato pode indicar a implantação de um parasito em animais de cativeiro, que pode ser devido ao manejo do zoológico ou a região onde ele se encontra. A detecção de *T. vivax* em bovinos no estado de Minas Gerais foi recentemente relatada em um surto que acometeu bovinos leiteiros em uma fazenda localizada em Igarapé, município próximo a Belo Horizonte (Cuglovici et al. 2010).

Em relação aos veados-campeiros oriundos de MS, era esperado encontrar um maior número de animais positivos tanto para *T. vivax* quanto para *T. evansi*, por se tratar de uma região endêmica para esses tripanosomatídeos. A baixa frequência encontrada pode ser explicada pelo fato do DNA extraído das amostras serem oriundos de papa de hemácia. No momento da centrifugação do sangue dos animais, os *Trypanosoma* tendem a se concentrar entre a camada de leucócito e o plasma (Woo 1970). Durante o processo da separação do plasma e das papas de hemácias, geralmente a camada de leucócito também é removida, e com ela a maioria dos *Trypanosoma*. Cabe ressaltar que a única combinação de iniciadores efetiva para o diagnóstico de *T. vivax* foi a representada por somente uma reação de PCR, o que também diminui a sensibilidade do teste.

Espécimes de carrapatos só foram encontrados em cervídeos de vida livre e as espécies de ixodídeos encontradas são comumente ectoparasitos de animais domésticos. Serra-Freire (1997) relata que *A. cajennense*, *D. nitens* e *R. microplus* só foram encontrados em *M. gouazoubira* que viviam nas proximidades de propriedades de exploração zootécnica. Esse é o caso dos veados-catingueiros encontrados infestados no presente estudo.

Com exceção do gênero *Trypanosoma*, carrapatos possuem um papel crucial na transmissão dos hemoparasitos estudados, já que constituem os seus hospedeiros intermediários. O conhecimento dos vetores de parasitos é de bastante relevância para a compreensão da biologia e epidemiologia da doença causada por ele. As espécies de ixodídeos vetoras de *Theileria* spp. para cervídeos brasileiros não eram conhecidas até o momento, já que o vetor sabidamente conhecido, *A. americanum*, não foi descrito em território brasileiro. No presente estudo, foi detectada a presença de *Theileria* sp. na glândula salivar de *D. nitens* oriundos do cervídeo MGI8, sabidamente portador de *T. cervi* no sangue total, fígado e cérebro. Esse fato indica que esse carrapato é transmissor de *Theileria* para cervídeos brasileiros. *Dermacentor nitens* é conhecido como um ectoparasito de importância em eqüinos tanto por danos diretos causado pelo parasitismo quanto por ser vetor de *Babesia caballi*. Porém esse carrapato também tem sido encontrado populações silvestres, tendo, assim, importância direta e vetorial também para esses animais (Camargo-Neves 2004).

Algumas amostras de *A. marginale* não são infectantes ou transmitidas por carrapatos (Kocan et al. 2004). A detecção de *A. marginale* na glândula salivar de *R. microplus* oriundo do cervídeo MGI17, positivo para esse agente na amostra de sangue total, indica que essa amostra provavelmente é transmitida por esses ixodídeos.

Em relação aos testes diagnósticos, considerando que testes indiretos detectam anticorpos, vale ressaltar que uma positividade indica que o animal entrou em contato com o agente infeccioso e produziu uma resposta imunológica contra esse agente. Anticorpos específicos podem ser detectados tempo depois de o animal ter debelado a infecção. Metodologias de diagnóstico indiretas para detecção de anticorpos e PCR sem sequenciamento nucleotídicos dos produtos positivos podem não chegar a um diagnóstico específico de parasitos geneticamente próximos, como os dos gêneros *Babesia* e *Theileria*. Já testes parasitológicos diretos indicam a presença do parasito no hospedeiro, e no caso de testes moleculares, mesmo em baixa parasitemia é possível a detecção do DNA do agente infeccioso. Isso indica que mesmo que os cervídeos apresentem sorologia positiva para hemoparasitos, não significa que esses animais são capazes de carrear a infecção por um longo período.

O conceito de reservatório apresenta diferentes definições na literatura. Segundo Abdussalam (1959), é importante considerar a condição de reservatório como temporal e espacial e a partir de uma abordagem sistêmica, pois a interação entre os parasitos e as espécies susceptíveis apresenta um caráter dinâmico devido às variadas pressões seletivas. Essas pressões ocorrem por parte do parasito, como as estratégias de reprodução e transmissão, e também por parte dos hospedeiros, como seu comportamento e as mudanças que ocorrem em seu habitat. As mudanças no perfil epidemiológico de diversas parasitoses, emergência de novas doenças ou reemergência de outras consideradas controladas, ocorrem devido a essas interações entre parasito e hospedeiro.

Haydon et al. (2002) definem reservatório como uma ou mais populações conectadas epidemiologicamente ou ambientalmente nas quais o patógeno pode ser mantido permanentemente e a infecção é transmitida para a população-alvo. Segundo os autores, para a identificação de um reservatório, deve-se incluir: o acúmulo de evidências

epidemiológicas que associam o potencial reservatório com a população-alvo; a evidência da infecção natural na população não alvo (através de identificação prévia da infecção por detecção de anticorpos ou por isolamento do agente infeccioso ou detecção do seu gene no hospedeiro) somada à transmissão para a população-alvo (através de infecção experimental); além da caracterização genética do patógeno em diferentes populações e a delimitação da população-alvo.

Por isso, é necessária cautela para definir uma espécie como reservatório, já que espécies assim classificadas apresentam visão negativa, o que prejudica principalmente animais silvestres ameaçados. Nesse contexto, para classificar cervídeos como reservatórios dos parasitos encontrados na presente pesquisa, são necessários maiores estudos envolvendo todos os itens descritos acima.

O conhecimento das espécies de parasitos em uma determinada população é importante no direcionamento de ações conservacionistas para animais selvagens, pois fornece a base para o entendimento da ecologia das enfermidades. Programas de reintrodução ou translocação de fauna são especialmente questionados nesse aspecto, porque a relação parasito-hospedeiro não pode ser monitorada de perto no novo habitat, e os animais introduzidos podem estar susceptíveis a enfermidades ou disseminar os patógenos para a fauna local. Essas considerações são válidas inclusive quando os animais são trazidos para o cativeiro, pois as alterações ambientais e o estresse os tornam mais susceptíveis a enfermidades, possibilitando, inclusive, a ocorrência de manifestações clínicas em animais portadores, com probabilidade de disseminação desses patógenos (Szabó et al. 2003). Duarte (2007) relata que a prevalência de hemoparasitos em cervídeos que se encontram em áreas de reservas ambientais, sem um contato direto com ruminantes domésticos, reflete a condição sanitária verdadeira daquela população, enquanto veados que habitam áreas concomitantes com bovinos podem sofrer influências dos agentes infecciosos dos ruminantes domésticos.

Os cervídeos são ruminantes notadamente sensíveis aos fatores que resultam em sensação de medo ou estresse. Como consequência aos estímulos estressantes, frequentemente são observadas lesões traumáticas e alterações fisiopatológicas. Em relação às alterações fisiopatológicas, podem ser observados sérios problemas cardiorrespiratórios e distúrbios metabólicos graves, como a acidose e a miopatia de

captura (Fowler 1993; Dias 1997). Em situações de estresse prolongado os animais podem entrar em um estado de imunossupressão, favorecendo o aparecimento de sintomas clínicos pela presença de parasitos que estavam latentes. Esse fato deve receber especial atenção em animais que vivem em cativeiro e no momento de contenção de animais de vida livre quando precisam ser submetidos a alguma intervenção.

A amostra de *A. marginale* oriunda do cervídeo MGI5 não foi estabelecida com sucesso em cultivo *in vitro* de IDE8. A presença do agente no cultivo foi verificada, mas os corpúsculos iniciais do micro-organismo não formaram colônias típicas nas células IDE8. O inóculo sanguíneo utilizado para infectar as células apresentava baixa parasitemia, mesmo após a passagem em bezerro, o que pode também ter dificultado o estabelecimento do *A. marginale* no cultivo celular. Estudos continuarão sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa com objetivo de isolamento de amostras brasileiras de Anaplasmataceae oriundas de cervídeos brasileiros.

As amostras de *A. marginale* oriundas dos cervídeos MGI5 e MGI8 não foram capazes de gerar febre e queda de hematócrito, mesmo para ruminantes esplenectomizados, indicando que essas amostras possuem baixa virulência para ruminantes domésticos. Porém, quando os bezerros foram desafiados com a amostra de *A. marginale* UFMG2 não foram capazes de debelar a infecção, indicando que os bezerros não desenvolveram uma imunidade protetora. Os animais desafiados estavam esplenectomizados e o baço é um órgão de grande importância na captura e destruição de hemácias parasitadas, sendo esse um possível motivo de os bezerros não terem desenvolvido uma resposta imune efetiva contra a amostra desafio. Além disso, a dose do inóculo desafio foi muito superior à dose que um carrapato vetor inocularia em condições naturais. Posteriores estudos serão desenvolvidos visando desafiar bezerros não esplenectomizados e inoculados previamente com amostras oriundas de cervídeos.

7. CONCLUSÕES

- Cervídeos (*M. gouazoubira*, *O. bezoarticus* e *B. dichotomus*) pertencentes aos estados de Minas Gerais e de Mato Grosso do Sul são frequentemente parasitados por hemoparasitos, dentre eles: *Anaplasma* sp., *A. marginale*, *A. bovis*, *E. chaffeensis*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *Theileria* sp., *T. cervi* e *T. evansi*;
- Cervídeos de vida livre pertencentes aos estados de Minas Gerais são frequentemente infestados por espécies de carrapatos que comumente parasitam os animais domésticos, sendo elas: *A. cajennense*, *D. nitens* e *R. microplus*;
- Em glândulas salivares de *R. microplus*, oriundos de cervídeos, houve ocorrência de *A. marginale*, e em glândulas salivares de *D. nitens*, oriundos de cervídeos, foi sugestivo a presença de *Theileria* sp.;
- Amostra de *A. marginale* oriunda de cervídeo não estabelece adequadamente em cultivo de células IDE8, apesar de evidências de que o micro-organismo esteve presente nessas células;
- As amostras de *A. marginale* oriundas dos cervídeos possuem baixa virulência para ruminantes domésticos.

8. REFERÊNCIAS

Abdussalam M 1959. Significance of ecological studies of wild animal reservoir of zoonoses. *Bull World Health Organ* 21: 179-186. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1959/Vol21/Vol21No2/bulletin_1959_21%282%29_179-186.pdf

Aguiar DM, Saito TB, Hagiwara MK, Machado RZ, Labruna MB 2007. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural* 37: 796-802.

Alonso M, Arellano-Sota C, Cereser VH 1992. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Vet Sci Tech Off Int Epiz* 11: 713-733.

Barbet AF 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Vet Parasitol* 57: 43-49.

Barbosa J 2003. *Validação do uso de n-alcalanos como indicadores para estudos nutricionais em veados-catingueiros (Mazama gouazoubira)*, Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP, Piracicaba, 79pp.

Barkan D, Ginsburg H, Golenser J 2000. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in Plasmodium-infected mice. *Int J Parasitol* 30: 649-653.

Barker RW, Hoch AL, Buckner RG, Hair JA 1973. Hematological changes in White-tailed-deer fawns *Odocoileus virginianus*, infested with *Theileria*-infected lone star ticks. *J Parasitol* 59: 1091-1098.

Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, de Almeida MA, Melo EP, Kessler RH 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 613-617.

Bastos CV 2005. *Avaliação de condições de manutenção e criopreservação do cultivo in vitro de células IDE8*, Dissertação de mestrado, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 39pp.

Bastos CV, Vasconcelos, MMC, Ribeiro, MFB, Passos, LMF 2006. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of in vitro-cultured IDE8 tick cells. *Exp Appl Acarol* 39: 347-352.

Bastos CV, Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB, Passos, LMF 2007. Manutenção in vitro de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. *Arq Bras Med Vet Zoo* 59: 543-546.

Bastos CV, Passos LMF, Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB 2009. *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz J Microb* 9: 399-403.

Bastos, CV, Passos LMF, Facury-Filho EJ, Rabelo EM, de la Fuente J, Ribeiro MFB 2010. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J* 186: 374-378.

Batista JS, Rodrigues CM, Olinda RG, Silva TM, Vale RG, Câmara AC, Rebouças RE, Bezerra FS, García HA, Teixeira MM 2011. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitol Res: In press*.

Blouin EF, Kocan KM 1998. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Riquétsiales: Anaplasmatacea) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cell. *J Med Entomol* 35: 788-797.

Bezerra FSB, Garcia HA, Alves HM, Oliveira IRS, Silva AE, Teixeira MMG, Batista JS 2008. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. *Pesq Vet Bras* 28: 575-582.

Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ 1995. Current state and future trends babesiosis. *Vet Parasitol* 57: 61-74.

Brown, CDG 1990. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parasitol* 32: 23-31.

Camargo - Neves VLF (Ed) 2004. *Manual de Vigilância Acarológica*. Secretaria de Estado da Saúde Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 62pp.

Cantu AC, Ortega SAJ, García-Vázquez Z, Mosqueda J, Henke SE, George JE 2007. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico. *J Wildl Dis* 43: 504-507.

Castro DC, Cicchino CA 1998. Anoplura. In *Biodiversidad de artrópodos Argentinos, Una perspectiva biotaxonomica*. Morrone J, Coscarón S (Eds.). Ediciones Sur, La Plata, Argentina, p. 125–143. Citado por: González-Acuña D, Saucedo GC, Corti P, Casanueva ME, Cicchino A 2009. First records of the louse *Solenopotes binipilosus* (Insecta: Phthiraptera) and the mite *Psoroptes ovis* (Arachnida: Acari) from wild southern huemul (*Hippocamelus bisulcus*). *J Wildl Dis* 45:1235-1238.

Chae J, Lee J, Kwon O, Holman PJ, Waghela SD, Wagner GG 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed-deer. *Vet Parasitol* 75: 41-52.

Cohn LA 2003. Ehrlichioses and related infections. *Vet Clin Small Anim Pract* 33: 863-884.

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB 2010. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 169: 320–326.

Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW, Dawson JE, Rechav Y 2001. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection in white-tailed-deer. *J Wildl Dis* 37: 538-546

Davila AM, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 117:1–13.

Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR, Lockhart JM, Nettles VF, Olson JG, Childs JE 1994a. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 32: 2725-2728.

Dawson JE, Childs JE, Biggie KL, Moore C, Stallknecht D, Shaddock J, Bouseman J, Hofmeister E, Olson JG 1994b. White-tailed-deer as a potential reservoir of *Ehrlichia* spp. *J Wildl Dis* 30: 162-167.

Deane, LM 1961. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica: Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do estado do Pará. *Rev Inst Med trop S Paulo* 3: 15-28.

Deem CL, Noss AJ, Villarroel L, Uhart MM, Karesh WB 2004. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco Bolivia. *J Wildl Dis* 40: 92–98.

de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2001a. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 31: 145–153.

de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Kocan KM 2001b. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet Parasitol* 97: 65–76.

de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Rodríguez SD, Garcia MA, Kocan KM 2001c. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev* 2: 163–173.

de la Fuente J, Passos LMF, Van Den Bussche RA, Ribeiro MFB, Facury-Filho EJ, Kocan KM 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121: 307–316.

de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V, Torina A, Rodríguez O, Gortázar C 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci* 84: 382-386.

Desquesnes M, Gardiner PR 1993. Épidémiologie de la trypanosome bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane Française. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 46: 463-470.

Desquesnes M, Dávila AMR 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol* 109: 213-231.

Dias JLC 1997. Miopatia de captura. In Duarte JMB (Ed). *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p. 172-179.

Dikmans G 1950. The transmission of anaplasmosis. *Am J Vet Res* 38: 5-16.

Duarte JMB 1996. *Guia de identificação de cervídeos brasileiros*, Jaboticabal, FUNEP, 14pp.

Duarte JMB (Ed) 1997. *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, 238pp.

Duarte JMB 2006. Artiodactyla – Cervidae (Veado - catingueiro, Veado-campeiro, Cervo - do - pantanal) In Cubas ZS (Ed) *Tratado de animais selvagens - Medicina Veterinária* São Paulo, Roca, p. 641-664.

Duarte JMB 2007. Aftosa and other diseases in wildlife. In *One world one health: Healthy ecosystems, Livestocks and Human Livelihoods: An innovative Public-private Partnership*, Oral presentation. [Acesso em: 19 de agosto 2010]. Disponível em: <http://www.oneworldonehealth.org/oct2007/presentations/duartehtml>

Dumler JS, Barbet Af, Bekker CPJ, Daseh GA, Palmer GA, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2145-2165.

Duh D, Petrovec M, Bidovec A, Avsic-Zupanc T 2005. Cervids as Babesiae hosts, Slovenia. *Emerg Infect Dis* 11: 1121-1123.

Elder JF Jr, Turner BJ 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70: 297-320.

Ewing SA 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In *National Anaplasmosis Conference 7*, Mississippi State University, MS *Proc Mississippi State University*, p. 395-423.

Figueroa JV, Buening GM 1995. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tickborne hemoparasites of veterinary importance. *Vet Parasitol* 75: 75-92.

Fowler ME (Ed) 1993. *Zoo and wild animal medicine current therapy*, Philadelphia, W B Saunders Company, 617pp.

Fowler ME 2000. *Medicina Veterinária Preventiva para animais silvestres*. Anais XXIV Encontro da Sociedade de Zoológicos e V Encontro Internacional de Zoológicos, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Franke CR, Greiner, M, Mehlitz D 1994. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone´ (Mato Grosso, Brasil). *Acta Trop* 58: 159–169.

Fukata T, Ohnishi T, Okuda S, Sasaki K, Baba E, Arakawa A 1996. Detection of canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni* by flow cytometry. *J Parasitol* 82:641–642.

Galiza GJ, Garcia HA, Assis AC, Oliveira DM, Pimentel LA, Dantas AF, Simões SV, Teixeira MM, Riet-Correa F 2011. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. *Vet Parasitol* 15: 359-363.

Gardiner PR 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv Parasitol* 28: 229-313.

Ge NL, Kocan KM, Blouin EF, Murphy GL 1996. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Riquétsiales: anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using non-radioactive in situ hybridization. *J Med Entomol* 33: 911-920.

González-Acuña D, Saucedo GC, Corti P, Casanueva ME, Cicchino A 2009. First records of the louse *Solenopotes binipilosus* (Insecta: Phthiraptera) and the mite *Psoroptes ovis* (Arachnida: Acari) from wild southern huemul (*Hippocamelus bisulcus*). *J Wildl Dis* 45:1235-1238.

Guglielmone, AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-120.

Han JI, Jang HJ, Lee SJ, Na KJ 2009. High prevalence of *Theileria* sp. in Wild Chinese Deer (*Hydropotes inermis argyropus*) in South Korea. *Vet Parasitol* 164: 311-314.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK, 2002. Identifying reservoir of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 8: 1468-1473.

Herrera HM, Dávila AMR, Norek A, Abreu UGP, Souza SS, D'andrea OS, Jansen AM 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 125:263–275.

Herrera HM, Abreu UG, Keuroghlian A, Freitas TP, Jansen AM 2008. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitol Res* 103:619-24.

Herrera HM, Dávila AMR, Souza SS, Parreira DR, Abreu UGP, Borges PAL, Lacerda ACR, Zucco CA, Tomás WM, Mourão GM 2010. Infecção por *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* em veado-campeiro (*Ozotozeros bezoarticus*, Cervidae, Perisodactyla) no pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer E 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning In: Hillis DM, Craig M, Mable BK (Ed) *Molecular Systematics* Massachusetts, Edition Sinauer Associates Inc Sunderland, p.321-337.

Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of mammals. A zoological monograph*, Oxford, England, Blackwell Scientific Publications, 750 pp.

Höfle U, Vicente J, Nagore D, Hurtado A, Peña A, de la Fuente J, Gortazar C 2004. The risks of translocating wildlife pathogenic infection with *Theileria* sp and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. *Vet Parasitol* 126: 387-395.

IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura 1987. *Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina*, San José, IICA, 79pp.

Inokuma H, Tsuji M, Kim SJ, Fujimoto T, Nagata M, Hosoi E, Arai S, Ishihara C, Okuda M 2004. Phylogenetic analysis of *Theileria* sp from sika deer, *Cervus Nippon*, in Japan. *Vet Parasitol* 120: 339-345.

IUCN-Red List of Threatened Species [Acesso em: 03 de agosto de 2007; 28 de janeiro de 2012]. Disponível em: www.iucnredlist.org

Jiménez-Díaz MB, Mulet T, Gómez V, Viera S, Alvarez A, Garuti H, Vázquez Y, Fernández A, Ibáñez J, Jiménez M, Gargallo-Viola D, Angulo-Barturen I 2009. Quantitative measurement of Plasmodium-infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. *Cytometry A* 75: 225-35.

Kawahara M, Tajima T, Torii H, Yabutani M, Ishii J, Harasawa M, Isogai E, Rikihisa Y 2009. *Ehrlichia chaffeensis* infection of Sika deer, Japan. *Emerg Infect Dis* 15: 1991-1993.

Keel MK, Goff WL, Davidson WR 1995. An assessment of the role of White-tailed deer in the epizootiology of anaplasmosis in the southeastern United States. *J Wild Dis* 31: 378-385.

Kocan, KM 1986. Development of *Anaplasma marginale* Theiler in ixodid ticks: coordinated development of a riquétsial organism and its tick host. In Sauer, JR; Hair, JA (Eds) *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks* New York, John Wiley & Sons, p. 472-505.

Kocan A, Kocan KM 1991. Tick-transmitted protozoan diseases of wildlife in North America. *Bulletin of the Society of Vector Ecology* 16: 94-108.

Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, McGuire TC, Hair JA, Barron SJ 1992. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 53: 499-507.

Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16: 698-712.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC 2004. *Anaplasma marginale* (Riquétsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne riquétsia. *Parasitol* 129: 285–300.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing AS 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167: 95-107.

Kreier JP, Ristic M, Watrach AM 1962. *Theileria* sp. in a deer in the United States. *Am J Vet Res* 23: 657-662.

Kreier JP, Ristic M 1963. Anaplasmosis VII Experimental *Anaplasma ovis* infection in White-tailed-deer (*Dama Virginiana*). *Am J Vet Res* 24: 567-572.

Kreier JP (Ed) 1977. *Parasitic Protozoa Vol IV*, London, Academic Press.

Kuttler KL, Robinson RM, Bell RR 1967. Tick transmission of theileriosis in white-tailed-deer. *Bulletin of the Wildlife Disease Association* 3: 182-183.

Kuttler KL 1984. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J Wildl Dis* 20: 12-20.

Kuttler KL, Zaugg JL 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod* 20: 85-91.

Laird JS, Kocan AA, Kocan KM, Presley SM, Hair JA 1988. Susceptibility of *Amblyomma americanum* to natural and experimental infections with *Theileria cervi*. *J Wildl Dis* 24: 679-683.

Lesk AM (Ed) 2008. *Introdução à bioinformática*, Porto Alegre, Artmed, 384pp.

Linardi PM, Guimarães LR 2000. *Sifonápteros do Brasil*, Museu de Zoologia USP/FAPESP, São Paulo, 291p.

Lin M, Rikihisa Y 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun* 71: 5324–5331.

Little SE, Dawson JE, Lockhart JM, Stallknecht DE, Warner CK, Davidson WR 1997. Development and use of specific polymerase reaction for the detection of an organism resembling *Ehrlichia* spp in white-tailed deer. *J Wildl Dis* 33: 246-253.

Little SE, Stallknecht DE, Lockhart JM, Dawson JE, Davidson WR 1998. Natural coinfection of a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) population with three *Ehrlichia* spp. *J Parasitol* 84: 897-901.

Losos GJ (Ed) 1986. *Infectious Tropical diseases of Domestic animals*, Canada, Longman Scientific & Technical, 938pp.

Machado RZ, Muller E 1996. Frequencia de anticorpos contra *Babesia* em Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal e no Parque das Emas. In Duarte JMB (Ed) *Relatorio Final de Pesquisas do Projeto Veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus)* Brasilia, FNMA, p.124–132 (citado por: Duarte JMB 2006. Artiodactyla – Cervidae (Veado - catingueiro, Veado-campeiro, Cervo - do - pantanal) In Cubas ZS (Ed) *Tratado de animais selvagens - Medicina Veterinária* São Paulo, Roca, p. 641-664.

Machado RZ, Duarte JMB, Dagnone AS, Szabó MPJ 2006a. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Vet Parasitol* 139: 262-266.

Machado RZ 2006b. Erliquioses nos animais domésticos e silvestres do Brasil. Anais XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ribeirão Preto, São Paulo, p.163-166.

Madruga C 2004. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Ver Bras Parasitol Vet* 13: 46-47.

Malan FS, Horak IG, de Vos V, van Wyk JA 1997. Wildlife parasites: Lessons for parasite control in livestock. *Vet Parasitol* 71: 137-153.

Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG 1998. Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 36: 1090-1095.

McCosker PJ 1981. The global importance of babesiosis. In Ristic M, Kreier PJ (Eds) *Babesiosis*, New York, Academic Press, p.1-24.

McGarey DJ, DR Allred 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial bodysurface and identification of possible adhesions. *Infect Immun* 62: 4587-4593.

McGarey DJ, AF Barbet, GH Palmer, TC McGuire, DR Allred 1994. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun* 62: 4594-4601.

Menck CFM, Sluys MAV 2004. Fundamentos da biologia molecular. In Mir L (Ed) *Genômica*, São Paulo, Atheneu, p.3-19.

Merino ML, Gonzales S, Leeuwenberg F, Rodrigues FHG, Pinder L, Tomas WM 1997. Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*). In Duarte JMB (Ed). *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p. 42-58.

Moreira SM 2005. *Erliquiose monocítica canina experimental: avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos, antes e após o cloridrato de tetraciclina*, Tese de doutorado, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 79pp.

Moretta R, Ruybal P, Mesplet M, Petrih R, Nuñez P, Gil G, Wilkowsky S, Garbossa G, Farber M 2008. Flow cytometry to evaluate *Anaplasma marginale* parasitemia using a fluorescent nucleic acid stain. *Ann N Y Acad Sci* 1149:111-113.

- Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtti TJ 1994. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 80: 533-543.
- Munderloh UG, Tate CM, Lynch MJ, Howerth EW, Kurtti TJ, Davidson WR 2003. Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from White-tailed-deer by tick cell culture. *J Clin Microbiol* 41: 4328-4335.
- Noh SM, Zhuang Y, Futse JE, Brown WC, Brayton KA, Palmer GH 2010. The immunization-induced antibody response to the *Anaplasma marginale* major surface protein 2 and its association with protective immunity. *Vaccine* 28: 3741-3747.
- Nunes ALV, Gasparini RL, Duarte JMB, Pinder L, Buschinelli MC 1997. Captura, contenção e manuseio. In Duarte JMB (Ed). *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p. 142-170.
- Osório ALAR, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Costa SCG 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the new world—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:1–13.
- Otte MJ, Abuabara JY, Wells EA 1994. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Trop Anim Health Prod* 26: 146-156.
- Perry BD, Nichols DK, Cullom ES 1985. *Babesia odocoilei* Emmerson and Wright, 1970, in White-tailed-deer, *Odocoileus virginianus* in Virginia. *J Wildl Dis* 21: 149-152.
- Pesquisa FAPESP 2008. *Patógenos emergentes*, Edição Impressa 153, p.23.
- Picoloto G, Ferreira de Lima R, Olegário LAO, Carvalho CME, Lacerda ACR, Tomás WM, Borges PAL, Pellegrin AO, Madruga CR 2010. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet* 19: 186-188.
- Pinder L 1996. Marsh Deer population estimate in Paraná river, Brazil. *Biological conservation* 75: 87-91.

Pinder L 1997. *Niche overlap among brown brocket deer, pampas deer and cattle in the Pantanal of Brazil*, Dissertation, University of Florida, Gainesville.

Pinder L, Leeuwenberg F 1997. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814) In Duarte JMB (Ed) 1997. *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p. 60-68.

Ramos CM, Cooper SM, Holman PJ 2010. Molecular and serologic evidence for *Babesia bovis*-like parasites in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in south Texas. *Vet Parasitol* 172: 214-220.

Reid S, Husein A, Hutchinson G, Copeman D 1999. A possible role for Rusa Deer (*Cervus timorensis russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 195-197.

Ribeiro MFB, Lima JD 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 61: 31-39.

Richey EJ 1981. Bovine anaplasmosis. In Howard, JR (Ed). *Current veterinary therapy food animal practice*, Philadelphia, The WB Saunders Co, p. 767-772.

Rikihisa Y 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol* 8: 328-339.

Ristic M, Carson CA 1977. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In Miller LH, Pino JA, McKelvey JJ (Eds) *Immunity to blood parasites of animal and man: advances in experimental medicine and biology*. New York, Plenum Publishing Corp, p. 151-188.

Ristic M (Ed) 1988. *Babesiosis of domestic animals and man*, Florida, Boca Raton, CRC Press, 255pp.

Rogers RJ, Dimmock CK, De Vos AJ, Rodwell BJ 1988. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vitro* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J* 65: 285-287.

Sacchi ABV, Machado RZ, Duarte JMB, André MR 2008. Seroepidemiology of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Porto Primavera hydroelectric power station, Paraná River, Brazil. *Anais Sixth International Conferences on ticks and ticks-borne pathogens*, BuenosAires, Argentina p. 321

Sacchi ABV, Machado RZ, Duarte JMB, André MR 2009. Seroepidemiology of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Porto Primavera hydroelectric power station, Paraná river, Brazil. *Anais 10ht Biennal Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine*, Lübeck, Germany p.87.

Schaeffler WF 1967. *Theileria cervi* infection White-tailed-deer (*Dama virginiana*) in the United States. PhD Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois, 104pp. Citado por Kocan AA, Mukolwe SW, Laird JS 1987. Failure to detect infection in Fallow-deer (*Cervus dama*) exposed to *Theileria cervi* from White-tailed-deer. *J Wildl Dis* 23: 674-676.

Schalm OW (Ed) 1986. *Schalm's Veterinary hematology*, Philadelphia, Lea & Febiger, 1169pp.

Serra-Freire NM 1997. Ectoparasitos. In Duarte JMB (Ed), *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p.182-194.

Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – *Biologia, Diagnóstico e Controle*, Corumbá, MS, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 140 p.

Silveira JAG, Rabelo EML, Ribeiro MFB 2011. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 177: 61-66.

Silveira JAG, Rabelo EML, Ribeiro MFB 2011. 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). *Transbound Emerg Dis: In press*.

Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1989. Transestadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am J Vet Res* 50: 1377-1380.

Stuen S, Von Loewenich F, Bergsröm K 2008. Red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir host for *Anaplasma phagocytophilum* infection in sheep. *Anais Sixth International Conferences on ticks and ticks-borne pathogens*, Buenos Aires, Argentina p. 293.

Stuht JN 1977. Morphology of Trypanosomes from White-tailed deer and Wapiti in Michigan. *J Wildl Dis* 11: 256-262.

Soulsby EJJ (Ed) 1986. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*, England, Baillière Tindall, 809pp.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Szabó MPJ, Labruna MB, Pereira MC, Duarte JM 2003. Ticks (Acari: Ixodidae) in Wild Marsh Deer (*B. dichotomus*) from Southeast Brazil: Infestation before and after habitat loss. *J Med Entomol* 40: 268-274.

Theiler A 1910. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In Theiler, A. (Ed.), *Report of the Government on Veterinary Bacteriology in Transvaal*. Department of Agriculture, South Africa, 1908–1909, p. 7–64.

Tomas WM, Beccaceci MD, Pinder L, 1997. Cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus*). In Duarte JMB (Ed). *Biologia e conservação de cervídeos Sul-americanos: Blastocercus, Ozotocercus e Mazama*, Jaboticabal, FUNEP, p. 24-40.

Van Soest PJ (Ed) 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. New York, Cornell University, 476pp.

Villas-Boas JC 2007. Survey of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* deer in the Pantanal wetland, Nhecolandia, Brazil. In *Babesia World Summit 2*, Palermo, Lombardo Editore, p.109. Cited by Cançado PHD, Zucco CA, Piranda EM, Faccini JLH, Mourao GM 2009. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 42–46.

Vogliotti de A 2003. *História natural de Mazama bororo (Artiodactyla; Cervidae) através de etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria*. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP, Piracicaba, 113pp.

Waldrup KA, Kocan AA, Qureshi T, Davis DS, Baggett D, Wagner GG 1989. Serological prevalence and isolation of *Babesia odocoilei* among White-tailed-deer (*Odocoileus virginianus*) in Texas and Oklahoma. *J Wildl Dis* 25:194-201.

Walker AR, McKellar SB, Bell LJ, Brown CGD 1979. Rapid quantitative assessment of *Theileria* infection in tick. *Trop Anim Hlth Prod* 11:21-26.

Weiss DJ 2002. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol* 31: 72-82.

Woo PTK 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 27: 384–386.

Yagi Y, Shiono H, Kurabayashi N, Yoshihara K, Chikayama Y 2000. Flow cytometry to evaluate *Theileria sergenti* parasitemia using the fluorescent nucleic acid stain, SYTO16. *Cytometry* 41:223-225.

Yasbley M J, Quick TC, Little E 2005. Theileriosis in a White-tailed-deer (*Odocoileus virginianus*) Fawn. *J Wildl Dis* 41: 806-809.

Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol* 89: 241-248.

Zaugg JL, Goff WL, Foreyt W, Hunter DL 1996. Susceptibility of Elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. *J Wildl Dis* 32: 62-66.