

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**HEMOCITOZOÁRIOS E ECTOPARASITOS EM ONÇAS-PINTADAS DE
VIDA LIVRE DO BIOMA PANTANAL**

RENATA FAGUNDES MOREIRA

PORTO ALEGRE

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**HEMOCITIZOÁRIOS E ECTOPARASITOS EM ONÇAS-PINTADAS DE
VIDA LIVRE DO BIOMA PANTANAL**

Autora: Renata Fagundes Moreira

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestra em Ciências
Veterinárias na área de Parasitologia.**

Orientador: João Fabio Soares

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Fagundes-Moreira, Renata
HEMOCITÓZOÁRIOS E ECTOPARASITOS EM ONÇAS-PINTADAS
DE VIDA LIVRE DO BIOMA PANTANAL / Renata
Fagundes-Moreira. -- 2020.
82 f.
Orientador: João Fabio Soares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Panthera onca. 2. hemoparasito. 3. ectoparasito. 4. avaliação sanitária. 5. conservação. I. Soares, João Fabio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Renata Fagundes Moreira

**HEMOCITÓZOÁRIOS E ECTOPARASITOS EM ONÇAS-PINTADAS DE
VIDA LIVRE DO BIOMA PANTANAL**

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Fabio Soares
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Rovaina Laureano Doyle
Membro da Comissão

Prof. Dr. José Reck Junior
Membro da Comissão

Dr^ª. Aline Giroto-Soares
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

À minha mãe, meus irmãos, minha vó e meus cachorrinhos.

AGRADECIMENTOS

Aos projetos de conservação e colaboradores: Onçafari, Panthera Brasil, Global Insular Conservation Society e Pró-Carnívoros. E demais colaboradores: Empty Clothing CO, Log Nature e Vet Expeditions.

Em especial ao médico veterinário Joares Adenilson May Junior pela confiança e à toda equipe de campo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e recursos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio e fomento.

À ProtozooVet que me deu a oportunidade de realizar o sonho de seguir pela pesquisa, ciência e docência. Em especial as pessoas que desde o primeiro dia estiveram presentes no meu caminho de formação e aprendizado e foram/são peças fundamentais: Ana Paula, Karina, Isadora, Priscila, Laura F, Laura S, Luciano, Viviane e Patricia. Em especial a Lina e ao Ugo pelo auxílio direto neste estudo.

Ao meu orientador, professor João Fabio Soares e Dra. Aline Giroto-Soares, que com palavras fica difícil descrever tudo que fizeram por mim nestes dois anos; agradeço todo auxílio, parceria, dedicação, puxões de orelha, motivações, confiança e sem dúvida, por SEMPRE acreditarem em mim.

Aos setores de Helmintologia, Patologia e Virologia pelo auxílio de logística neste ano conturbado; em especial à Cíntia pela ajuda na biomol e ao Vitório pelo café.

À minha mãe, Graça, peça fundamental para minha formação e motivação nos estudos desde a minha infância. Aos meus irmãos, Felipe e Vinícius, pela parceria e carinho. Ao meu namorado, Guilherme, que entrou na minha vida em um momento conturbado e com muita calma entendeu estas últimas semanas. Aos meus cachorrinhos: Aleusha, Brian, Eimeria, Melina e Loki.

In memoriam: Vovó Cecília, este mestrado é dedicado à tua eterna lembrança entre nós e todo orgulho que carregou dos “netos estudiosos”, te amamos. Lilica, Neguinho, Laika, Ximango e Maragato.

Aos amigos que estiverem presentes (mesmo à distância) pelo carinho, apoio, palavras de motivação e compreensão neste ano de realizações. Em especial ao biólogo Darwin que sempre está à disposição para auxiliar nos projetos do laboratório.

Educação não transforma o mundo.

Educação muda pessoas.

Pessoas transformam o mundo.

Paulo Freire

RESUMO

As alterações ambientais e climáticas causadas principalmente pela antropização são fatores preocupantes na conservação de espécies silvestres no mundo. Com isso, a circulação de patógenos emergentes/ reemergentes e o parasitismo por ectoparasitos vetores pode agravar ainda mais a vulnerabilidade de espécies críticas. Portanto, o conhecimento sobre os agentes que infectam populações silvestres cria uma rede de informações que pode ser utilizada para fins de conservação e para a saúde pública. Tendo em vista as espécies de felídeos neotropicais ameaçadas de extinção, destaca-se a onça-pintada, o terceiro maior felino do mundo, possuindo diferentes graus de vulnerabilidade no território brasileiro. Em virtude deste cenário, o objetivo foi avaliar a presença de hemocitozoários e ectoparasitos como subsídio de informações sobre o *status* sanitário de onças-pintadas de vida livre do Bioma Pantanal. Ao todo 22 amostras de sangue foram analisadas por ensaios de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para diferentes hematozoários. Ectoparasitos foram coletados em 19 capturas. Foi possível avaliar amostras de sangue em 12 capturas (esfregaços de sangue e microhematócrito manual) e parâmetros fisiológicos (coloração das mucosas, peso/kg, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar) em todas as capturas (pelo menos dois parâmetros foram avaliados em cada captura). Nas análises moleculares, 100% obtiveram positividade para a Ordem Piroplasmida, Família Trypanosomatidae e *Mycoplasma* spp., além de 50% para o gênero *Hepatozoon*. Todas as amostras foram negativas para o gênero *Bartonella* e para a Família Anaplasmataceae. Larvas em terceiro ínstar de *Dermatobia hominis* foram identificadas em seis indivíduos e 454 carrapatos distribuídos no gênero *Amblyomma* e na espécie *Rhipicephalus microplus* foram identificados. Gamontes de *Hepatozoon* sp. e inclusão sugestiva de piroplasma foram identificados em leucócitos nas lâminas de esfregaço sanguíneo avaliadas. Não foi observada alterações nos parâmetros fisiológicos, mesmo nas onças-pintadas coinfectadas e com ectoparasitos. Dessa forma, é possível observar que as onças-pintadas sirvam como importantes reservatórios de patógenos no ambiente em que habitam, sendo necessário mais estudos para avaliar os possíveis vetores dos patógenos que circulam nestes indivíduos. Além disso, a manutenção destes estudos é importante devido as alterações ambientais que podem alterar a relação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, causar manifestações clínicas.

Palavras-chaves: *Panthera onca*, hemoparasito, ectoparasito, avaliação sanitária, conservação

ABSTRACT

The environmental and climatic changes caused mainly by anthropization are factors of concern in the conservation of wild species in the world. As a result, the circulation of emerging / reemerging pathogens and parasitism by vector ectoparasites can further aggravate the vulnerability of critical species. Therefore, knowledge about the agents that infect wild populations creates a network of information that can be used for conservation purposes and for public health. In view of the species of neotropical felids threatened with extinction, the jaguar stands out, the third largest feline in the world, with different degrees of vulnerability in Brazilian territory. In view of this scenario, the objective was to evaluate the presence of hemocytozoa and ectoparasites as a subsidy for information on the health status of free-ranging jaguars in the Pantanal Biome. In total, 22 blood samples were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) assays for different hematozoa. Ectoparasites were collected from 19 captures. It was possible to evaluate blood samples in 12 captures (blood smears and manual microhematocrit) and physiological parameters (mucosal color, weight/ kg, rectal temperature and capillary refill time) in all captures (at least two parameters were evaluated in each capture). In molecular analysis, 100% were positive for the Order Piroplasmida, Family Trypanosomatidae and Mycoplasma spp., in addition to 50% for the genus Hepatozoon. All samples were negative for the genus Bartonella and for the Family Anaplasmataceae. Larvae in the third instar of Dermatobia hominis were identified in six individuals and 454 ticks distributed in the genus Amblyomma and in the species Rhipicephalus microplus were identified. Gamonts of Hepatozoon sp. and suggestive inclusion of piroplasm were identified in leukocytes in the blood smear slides evaluated. There were no changes in physiological parameters, even in co-infected jaguars with ectoparasites. In addition, the maintenance of these studies is important due to environmental changes that can alter the parasite-host relationship and, consequently, cause clinical manifestations.

Keywords: Panthera onca, hemoparasite, ectoparasite, health assessment, conservation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Presença de gamontes de <i>Hepatozoon</i> sp. em monócitos da onça-pintada "PO17" (seta).	44
Figura 2: Presença de inclusão sugestiva de piroplasma em neutrófilo na onça-pintada "PO1/2014".	45
Figura 3: <i>Amblyomma ovale</i> macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.	48
Figura 4: <i>Amblyomma sculptum</i> macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.	48
Figura 5: Identificação de <i>Rhipicephalus microplus</i> macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.	49
Figura 6: Retirada por compressão manual de uma larva de <i>Dermatobia hominis</i> em uma onça-pintada do presente estudo.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Registros na literatura de parasitismo por carrapatos em onças-pintadas no mundo.....	21
Tabela 2: Listagem das sequências dos primers <i>foward</i> e <i>reverse</i> (respectivamente) utilizados para os protozoários analisados no presente estudo, os pares de base que amplificam e suas respectivas referências.....	32
Tabela 3: Sequências dos primers <i>foward</i> e <i>reverse</i> (respectivamente) utilizados para as análises de bactérias no presente estudo, os pares de base que amplificam e suas respectivas referências.	35
Tabela 4: Resultados individuais das análises moleculares com diferentes <i>primers</i> para pesquisa de hemoprotozoários.	37
Tabela 5: Resultados individuais das análises moleculares com diferentes <i>primers</i> para pesquisa de α -proteobactérias.	40
Tabela 6: Avaliação geral conforme os anos de coleta e os parâmetros de hematócrito, mucosas, tempo de preenchimento capilar, pesagem e temperatura retal dos indivíduos do presente estudo.	42
Tabela 7: Identificação individual dos carrapatos coletados das onças-pintadas do presente estudo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA - 16S ribosomal RNA

18S rRNA - 18S ribosomal RNA

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

COMPESQ – Comissão de Pesquisa Veterinária

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

F – fêmea

Ht – hematócrito

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

ID – identificação

IFA - imunofluorescência indireta

M – macho

MS – Mato Grosso do Sul

N - número

Nº - número

PA -Pará

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia polimerase

PF– *primer forward*

PR - *primer reverse*

ProtozooVet – Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Veterinárias

rDNA - ácido desoxiribonucleico ribossomal

REC – Refúgio Ecológico Caimã

RNA - ácido ribonucleico

RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural

rRNA - ácido ribonucleico ribossômico

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VCC - vírus da cinomose canina

VHF - Very High Frequency

VSG – variable surface glycoprotein

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

μM - micromolar

CO₂ - dióxido de carbono

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

kg – quilogramas

mg – miligramas

mM – milimolar

ng – nanogramas

°C – graus Celsius

™ - trademark symbol

U – unidade

μL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 <i>Panthera onca</i>	19
3.2 <i>One Health, One World</i>	20
3.3 Ectoparasitos	21
3.3.1 Doenças transmitidas por vetores	23
3.4 Hemocitozoários	23
3.4.1 Ordem Piroplasmida	23
3.4.2 Família Trypanosomatidae	24
3.4.3 Gênero <i>Hepatozoon</i>	25
3.4.4 Família Anaplasmataceae	26
3.4.5 Hemoplasma	26
3.4.6 Gênero <i>Bartonella</i>	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Área de estudo	28
4.2 Ética	28
4.3 Capturas	28
4.4 Amostras	29
4.5 Processamento das amostras	29
4.5.1 Extração de DNA e análise dos esfregaços sanguíneos	29
4.5.2. Ectoparasitos coletados	30
4.6 Análise molecular (Ensaio de Reação em Cadeia Polimerase/PCR)	30

4.6.1 PCR: Protozoários	30
4.6.1.1 Ordem Piroplasmida	30
4.6.1.2 Família Trypanosomatidae	31
4.6.1.3 Gênero <i>Hepatozoon</i>	31
4.6.2 PCR: Hemoplasma e α -proteobactérias	33
4.6.2.1 Hemoplasma	33
4.6.2.2 Família Anaplasmataceae	33
4.6.2.3 Gênero <i>Bartonella</i>	34
4.6.3 PCR: Amplificação das reações e eletroforese	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Análise molecular: protozoários	36
5.2 Análise molecular: hemoplasma e α-proteobactérias	39
5.3 Avaliação clínica geral e do hematócrito	42
5.4 Avaliação das lâminas de esfregaço sanguíneo.....	43
5.5 Identificação dos ectoparasitos	45
6 DISCUSSÃO.....	50
6.1 Protozoários	50
6.1.1 <i>Cytauxzoon felis</i>	50
6.1.2 <i>Trypasonoma evansi</i>	52
6.1.3 Gênero <i>Hepatozoon</i>	53
6.2 Hemoplasma e α-proteobactérias	54
6.2.1 <i>Mycoplasma</i> spp. e <i>Mycoplasma haemofelis</i>	54
6.2.2 Anaplasmataceae	55
6.2.3 Gênero <i>Bartonella</i>	55
6.3 Ectoparasitos identificados.....	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59

ANEXO A	80
----------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Um dos importantes papéis dos projetos e atividades de conservação, seja em cativeiro ou em vida livre, inclui a avaliação de doenças infecciosas e parasitárias em todo animal silvestre, uma vez que estes animais estão expostos a diferentes patógenos, condições epidemiológicas e ações antrópicas (MACDONALD, 1996; MURRAY *et al.* 1999). E para isso, o conhecimento dos patógenos que ocorrem em uma determinada população ou subpopulação auxilia na realização de medidas preventivas e profiláticas a serem aplicadas em manejos sanitários em ambientes ecológicos (LYLES & DOBSON, 1993).

Algumas doenças causadas por protozoários ou bactérias, principalmente doenças transmitidas por vetores, têm sido alvo de pesquisas em diferentes espécies de animais silvestres e em diferentes biomas brasileiros (LABRUNA *et al.*, 2004; SZABÓ *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2016; DALL'AGNOL *et al.*, 2017), isto porque a avaliação eco-epidemiológica torna-se um importante acréscimo na formação e repasse de dados sobre áreas de risco ou que necessitam de monitoramento constante, tanto para a sanidade de animais domésticos e silvestres quanto para a prevenção de casos humanos (WECK *et al.*, 2016).

Ao analisar o cenário atual das pesquisas sobre felídeos neotropicais é importante primeiramente ressaltar que todas as espécies encontram-se ameaçados de extinção nas avaliações das listas locais, nacionais e internacionais (NOWELL & JACKSON, 1996; MACHADO *et al.*, 2008; PAYAN & OLIVEIRA, 2016; QUIGLEY *et al.*, 2018), seja pela caça ilegal (LOVERIDGE *et al.*, 2010), confronto com humanos (HOOGESTIJN & HOOGESTIJN, 2010), perda de habitat pela expansão agropecuária, urbana e por hidrelétricas (SWANK & TEER, 1989; SANDERSON *et al.*, 2002), alterações climáticas (VALE *et al.*, 2015) ou atropelamento (OLIVEIRA, 1994).

Atualmente a fauna brasileira de felídeos silvestres é composta por nove espécies, sendo caracterizada por felídeos de grande porte, *Panthera onca* (onça-pintada) e *Puma concolor* (suçuarana ou onça-parda) e sete pequenos felídeos: *Leopardus pardalis* (jaguatirica), *Leopardus wiedii* (gato-maracajá), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato), *Leopardus gutullus* (gato-do-mato-pequeno), *Leopardus geoffroyi* (gato-do-mato-grande), *Leopardus colocola* (gato-palheiro) e *Herpailurus yagouaroundi* (gato-mourisco) (REIS *et al.* 2006; TRIGO *et al.* 2013a, 2013b, 2013c).

Visto o grau de vulnerabilidade em que os felídeos neotropicais estão situados sob diferentes ameaças, as pesquisas em busca de patógenos tendem a auxiliar projetos de conservação a adotar medidas para a aplicação prática. No entanto, fornecer dados biológicos provenientes de animais silvestres necessita de um aparato de iniciativas, financiamentos, projetos, conhecimento específico e mão de obra prática (AGUIRRE, 2008; WILSON *et al.*, 2016). Mas há uma clara necessidade que novos tópicos sejam aplicados a projetos de conservação, como observado por Tensen (2018) durante a compilação de publicações sobre a ordem Carnivora entre 2013 e 2017, mostrando que apenas 18% dos dados científicos publicados sobre felídeos silvestres são voltados para fatores relacionados à saúde e doenças, ao contrário dos canídeos, onde a maioria dos estudos são sobre sanidade.

Alguns estudos com mamíferos silvestres observaram o potencial sentinela e/ou reservatório frente a diversos patógenos (AGUIRRE, 2009; BRINKERHOFF *et al.*, 2009; JORGE *et al.*, 2013; FORNAZARI *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2019) ou elementos tóxicos (MAY JUNIOR *et al.*, 2018), principalmente em espécies bioacumuladoras e biomagnificadoras, mais especificamente espécies topo de cadeia. As espécies chaves desempenham uma importante função no equilíbrio ecológico (SIMBERLOFF, 1998) e *P. onca* está incluída neste segmento, devido principalmente ao seu caráter ecológico em controlar espécies-presas, porém existe uma complexidade ao avaliar agentes patogênicos em diferentes grupos de indivíduos dispersos pelos biomas brasileiros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetivo deste estudo foi avaliar a presença de hemocitozoários e ectoparasitos como subsídio para informações sobre o *status* sanitário de onças-pintadas de vida livre do bioma Pantanal.

2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a presença de hemoprotozoários por análise molecular;
- b. Avaliar a presença de hemoplasma e α -proteobactérias por análise molecular;
- c. Avaliar o hematócrito e possíveis alterações hematológicas passíveis de avaliação em lâmina de esfregaço sanguíneo;
- d. Avaliar a presença de ectoparasitos;
- e. Fornecer dados eco-epidemiológicos sobre a ocorrência de agentes patogênicos ou não patogênicos no ambiente em que os indivíduos habitam.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Panthera onca*

A onça-pintada ou jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) é o maior felino e predador das Américas, sendo o único representante do gênero *Panthera* no continente americano, estando distribuído em diferentes biomas da região neotropical (SUNQUIST & SUNQUIST, 2002). Historicamente, sua distribuição ocorria dos Estados Unidos ao norte da Argentina com uma vasta população que, atualmente, é representada por apenas metade da população inicial, com um declínio aproximado de 50% da população inicial em 50 anos (SEYMOUR, 1989; SANDERSON *et al.*, 2002). No Brasil, segundo dados oficiais, é considerada ameaçada de extinção em nível de vulnerável, tendo subpopulações significativas na Amazônia e Pantanal (ICMBIO, 2013).

Desde 1900, o declínio populacional de *P. onca* no Brasil é observado devido às principais ameaças à conservação da espécie, como: perda de habitat (causada pela exploração madeireira, expansão urbana e expansão agropecuária) (MORATO *et al.*, 2016), caça ilegal e por retaliação à predação de animais domésticos (HOOGESTEIJN *et al.*, 1993; NOWELL & JACKSON, 1996), diminuição da oferta de presas e outros conflitos com seres humanos (MURRAY *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.* 2005; ZELLER, 2007). Associado a estas ameaças, a interrupção do ciclo ecológico e a antropização, estes animais são expostos a diversos patógenos tornam-se um agravo para populações críticas (MURRAY *et al.*, 1999; FURTADO & FILONI, 2008).

A onça-pintada habitava os seis biomas brasileiros, porém em 1952 a última onça-pintada foi extinta do bioma Pampa, morta por caçadores (PETERS *et al.*, 2015). Hoje, habita os outros cinco biomas: Amazônia, Pantanal, Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga. Nestes, foram realizadas avaliações individuais para que a classificação de conservação fosse condizente com a população local dos indivíduos. Estima-se que a Amazônia abrigue mais de 10 mil indivíduos (JEDRZEJEWSKI *et al.* 2018) e o Pantanal abrigue mais de mil indivíduos (MORATO *et al.*, 2013). Diferente das onças-pintadas dos biomas Amazônia e Pantanal, que são classificadas como vulneráveis, as onças-pintadas dos biomas Mata Atlântica e Caatinga são classificadas como “em perigo” e “criticamente em perigo”, estimando menos de 250 indivíduos (MORATO *et al.*, 2013). Quanto ao Cerrado, há uma divergência na literatura, Morato *et al.* (2013)

estimam menos de 250 indivíduos, enquanto que Jedrzejewski *et al.* (2018) estimam mais de 250 indivíduos.

3.2 One Health, One World

Em 1939, a teoria proposta por Pavlovsky discorre que alguns microrganismos já se encontravam circulantes no meio ambiente, desenvolvendo-se em um nicho equilibrado, porém com o acesso do homem a estes ambientes, o descontrole poderia proporcionar o início do aparecimento de doenças (PAVLOVSKY, 1966). Leavell & Clark (1965) levantaram o conceito “homem-ambiente-agente” e “história natural das doenças” recebendo apoio das áreas voltadas para saúde e biologia. Ao final dos anos 70, doenças que eram associadas aos animais atingem humanos, como as causadas pelo vírus Rocio e Hantavírus, associado principalmente as alterações ambientais (LOPES, 1978; BRASIL, 1998).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), um em cada quatro óbitos no mundo em 2012 foram originados por alterações ambientais (ações antrópicas); estima-se que doenças diarreicas como a criptosporidiose, giardíase e outras, causaram 846 mil mortes no ano e malária 259 mil; essas alterações também aumentam a disseminação de diferentes patógenos entre as populações (PAGE *et al.*, 2011).

Dado o conceito saúde única onde há integração ecológica entre as saúdes ambiental, animal e humana, alguns fatores podem desencadear severas catástrofes entre populações silvestres como observado em estudos sobre epidemia de vírus da cinomose canina (VCC) em leões africanos. Em 1994, um surto dizimou 30% de uma população aproximada de 1000 leões africanos no Serengeti (ROELKE-PARKER *et al.*, 1996). Na época acreditava-se que os leões não eram sensíveis ao vírus (HARDER *et al.*, 1995), portanto, a hipótese para o surto seria o primeiro contato da população com o agente (OSTERHAUS, 2001), porém estudos retrospectivos observaram circulação do vírus até 1981 na mesma região, que durante alguns períodos ficava ausente (PACKER *et al.*, 1999).

Foi em 2008 que uma pesquisa revelou a interação entre o aumento extremo da temperatura com a desnutrição de búfalos no Serengeti, uma espécie chave na alimentação de carnívoros. Ao fim da seca e início das chuvas, os búfalos apresentaram cargas maiores de infestação por carrapatos (DE VOS & POTGIETER, 1994),

morrendo devido ao comprometimento nutricional. Os leões por sua vez se alimentavam destas carcaças, ocasionando um maior contato com carrapatos ali presentes. A coinfeção pelo gênero *Babesia* alcançou altos níveis em 1994, coincidindo com a alta mortalidade de leões durante o surto de VCC (MUNSON *et al.*, 2008). Estes dados exemplificam a sensibilidade no equilíbrio ecológico na relação parasito-hospedeiro e na quebra do ciclo saúde única.

3.3 Ectoparasitos

Os registros de parasitismo por carrapatos em *P. onca* são evidenciados em todos biomas que habitam atualmente, dentre os achados observam-se carrapatos das espécies mencionados na tabela 1.

Tabela 1: Registros na literatura de parasitismo por carrapatos em onças-pintadas no mundo.

(continua)

Registro na literatura	Referência
<i>Amblyomma</i> sp.	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); WIDMER, (2009); FURTADO (2010)
<i>Amblyomma cajennense (sensu lato)</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); DURDEN <i>et al.</i> (2006); WIDMER (2009); ARAGÃO (1936); FURTADO (2010)
<i>Amblyomma brasiliense</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005)
<i>Amblyomma coelebs</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005)
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005)
<i>Amblyomma ovale</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); ARAGÃO & FONSECA (1961); FURTADO (2010); SINKOC <i>et al.</i> (1998)
<i>Amblyomma parvum</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); DURDEN <i>et al.</i> (2006)
<i>Amblyomma tigrinum</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); DURDEN <i>et al.</i> (2006); FURTADO (2010)

(conclusão)

Registro na literatura	Referência
<i>Amblyomma triste</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); DURDEN <i>et al.</i> (2006); WIDMER (2009); FURTADO (2010)
<i>Amblyomma sculptum</i>	MARTINS (2004)
<i>Dermacentor nitens</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	LABRUNA <i>et al.</i> (2005); WIDMER (2009); FURTADO (2010)
<i>Ixodes affinis</i>	LOPES <i>et al.</i> (2016)
<i>Ixodes scapularis</i>	ALMAZAN <i>et al.</i> (2013)
<i>Ornithodoros rostratus</i>	MASSI PALLARÉS & USHER (1982)

Alguns destes carrapatos são conhecidos por transmitirem agentes patogênicos de importância para a saúde pública como *Rickettsia rickettsii* (LABRUNA, 2008).

Quanto ao parasitismo por pulgas, a tungíase, uma doença negligenciada causada por *Tunga penetrans*, foi observada em doze onças-pintadas no pantanal sul-mato-grossense, sendo então sugerido que o felídeo sirva como um disseminador da pulga na região do Pantanal (WIDMER & AZEVEDO, 2011). Furtado (2010) também registrou a presença de *T. penetrans* em onças-pintadas do Pantanal, porém em menor abundância. Além de *T. penetrans*, outras pulgas foram registradas parasitando onças-pintadas como *Ctenocephalides felis felis* (LINARDI & GUIMARÃES, 2000), *Pulex irritans* (DURDEN *et al.*, 2006), *Pulex porcinus* (ECKERLIN, 2005) e *Pulex (Juxtapulex) echidnophagoides* (TIPTON & MENDEZ, 1966).

A presença de miíase furuncular por larvas de *Dermatobia hominis* (bernes) foram visualmente registradas por câmeras *traps* devido a inchaços, porém sem a confirmação morfológica segundo HARMSEM (2006). Em onças-pintadas do Pantanal foram avaliadas duas larvas por Furtado (2010). A dermatobíase é uma doença de importância para saúde pública (ANDERSEN, 1962), além do mais, uma vez que, as lesões causadas pelas larvas de *D. hominis* podem fomentar o desenvolvimento de miíases biontófagas (GRISI *et al.*, 2014), estas por sua vez podem levar ao desenvolvimento de lesões que dificultam a caça ou levam a morte de indivíduos em uma população já vulnerável.

A infestação por *Cochliomyia hominivorax* em onça-pintada foi avaliada na Guiana em um ferimento de bala, segundo Rawlins *et al.* (1983) e por Furtado (2010) possivelmente em ferimentos de brigas, ressaltando um fator agravante para os indivíduos.

Até o momento desta revisão não havia registros de parasitismo por outros ectoparasitos na literatura.

3.3.1 Doenças transmitidas por vetores

Artrópodes hematófagos podem servir como vetores biológicos ou mecânicos de diversas enfermidades emergentes e reemergentes a animais domésticos e silvestres e o homem (PAROLA, 2005), entre eles destacam-se mosquitos, flebótomos, carrapatos, piolhos e pulgas (NÚNCIO & ALVES, 2014). Com isso, as alterações ambientais (antropização e mudanças climáticas) afetam diretamente o ciclo dos artrópodes e a relação parasito-hospedeiros (LABRUNA *et al.*, 2005; ESTRADA-PENA, 2009), sendo um importante fator para o aumento da circulação de vetores entre animais silvestres, domésticos e humanos (HOGGSTRAAL & KAISER, 1961).

Os carrapatos são considerados os principais vetores de doenças aos animais e o segundo principal vetor de doenças ao homem, estando atrás apenas dos mosquitos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; SONENSHINE & ROE, 2014). Obrigatoriamente todas as espécies de carrapatos requerem durante seu ciclo de vida o sangue de vertebrados (hematofagia) e devido a este hábito alimentar, muitas vezes sem especificidade de hospedeiro, podem transmitir agentes patogênicos como vírus, bactérias, helmintos e protozoários (HOSKINS & CUPP, 1988; CUPP, 1991; FUENTE *et al.*, 2008).

3.4 Hemocitozoários

3.4.1 Ordem Piroplasmida

Nas doenças transmitidas por carrapatos, destacam-se os piroplasmas, causadores da babesiose e cytauxzoonose; agentes amplamente distribuídos, infectando animais domésticos e silvestres. André (2008) observou sorologia positiva para *Babesia canis* em amostras de onças-pintadas de cativeiro de São Paulo e Distrito Federal, porém nenhuma amostra foi positiva na análise molecular, sugerindo que outros piroplasmas relacionados ao gênero *Babesia* e com antígenos semelhantes possam

apresentar reação cruzada em testes sorológicos. Este gênero tem influência na mortalidade de animais silvestres, principalmente quando associado a outros agentes virais (MUNSON *et al.*, 2008).

Assim como a cytauxzoonose é importante na mortalidade de felinos domésticos, uma vez que evolui para forma aguda com alta letalidade (WAGNER, 1976). André *et al.* (2009) avaliaram a presença de *Cytauxzoon felis* em onças-pintadas e outros felídeos de cativeiro sem sinais clínicos, sugerindo que estes animais sirvam de reservatórios do agente. Furtado *et al.* (2017) reafirmaram que as onças-pintadas possivelmente são peças fundamentais na manutenção de *C. felis* no ambiente silvestre (reservatório), necessitando mais estudos em diferentes áreas, indivíduos e subpopulações onde a onça-pintada habita.

3.4.2 Família Trypanosomatidae

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são responsáveis por causar doença aguda ou crônica em seres humanos e em animais domésticos e silvestres (BARRETT & CROFT, 2012). A detecção destes gêneros é importante para monitorar as áreas de risco, uma vez que a ocorrência destes patógenos é determinada pela circulação do agente etiológico, vetores e indivíduos susceptíveis, sendo fontes de infecções que podem agravar a sanidade de animais silvestres ameaçados (MÖRNER *et al.* 2002).

Mais precisamente, *Trypanosoma evansi* é um hemoparasito flagelado amplamente distribuído e um importante patógeno na saúde pública, principalmente por ser um dos agentes zoonóticos que causa a tripanossomíase, uma doença negligenciada. Existem diversos registros de detecções e surtos em animais como bovinos (FRANKE *et al.*, 1994), equinos (RODRIGUES *et al.*, 2005), cães (ECHEVERRIA *et al.*, 2019), tigre (UPADHYE *et al.*, 2000), camelos (DESQUESNES *et al.*, 2009), morcegos (HERRERA *et al.*, 2004) e no ser humano (JOSHI *et al.*, 2005; POWAR *et al.*, 2006).

A infecção por *T. evansi* para causar danos em hospedeiros depende de fatores como a eficácia da transmissão, sistema imune do hospedeiro e a capacidade do parasito sobreviver no hospedeiro (MISRA *et al.*, 2015). Com uma ampla distribuição geográfica e baixa especificidade em termos de vetores e hospedeiros, *T. evansi* permanece sem claras evidências do principal meio de transmissão, podendo ocorrer das seguintes formas: mecânica, biológica, vertical, horizontal, iatrogênica e por contaminação oral (DESQUESNES *et al.*, 2013).

Recentemente um caso raro de tripanossomíase por *T. evansi* foi relatado em um felino doméstico na Índia; o animal apresentou o sinal clínico clássico da doença, em outros animais, conhecido como “mal das cadeiras” (incapacidade de estender os membros), além de febre e alterações hematológicas e bioquímicas (SIVAJOTHI & REDDY, 2017). O felino habitava uma área com características epidemiológicas para tripanossomíase em búfalos (SIVAJOTHI *et al.* 2016), com acesso próximo a um matadouro, o que sugere que a infecção ocorreu devido às picadas de moscas no local ou à alimentação de carne infectada (RAINA *et al.*, 1985). Com isso, os estudos eco-epidemiológicos são fundamentais para avaliação de áreas de risco tanto para animais domésticos quanto silvestres, da mesma maneira que animais silvestres, uma vez que apresentem incoordenação nos membros posteriores provavelmente inviabilizaria a caça em vida livre.

A presença de *T. evansi* em onça-pintada foi observada durante um surto em um zoológico de Calcutá, o indivíduo que veio a óbito em 1967, apresentou sinais clínicos inespecíficos; o diagnóstico foi realizado por observação de formas evolutivas de *Trypanosoma* no esfregaço sanguíneo do coração e a suspeita final por *T. evansi* se deu pela resposta ao uso de uma medicação profilática em um indivíduo doente no mesmo zoológico que obteve cura, sugerindo que a causa dos óbitos foi por tripanossomíase por uma cepa patogênica (SINHA *et al.*, 1973).

3.4.3 Gênero *Hepatozoon*

A hepatozoonose, causada pelo gênero *Hepatozoon*, também é uma doença veiculada por artrópodes hematófagos sendo relatada acometendo diversas espécies de canídeos e felídeos silvestres (BROCKLESBY e VIDLER, 1963; MCCULLY *et al.*, 1975; LANE & KOCAN, 1983; AVERBECK *et al.*, 1990; METZGER *et al.*, 2007; ANDRÉ *et al.*, 2010), incluindo *P. onca*, no qual sugere-se um importante papel da onça-pintada na manutenção de *Hepatozoon* no ambiente silvestre (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2006; WIDMER, 2009; FURTADO *et al.*, 2017).

Apesar da hepatozoonose ter esse nome descrito, não há evidências que possa causar doença em humanos, além disso, em seus hospedeiros naturais causam raros agravos ou nenhum dano patológico (TELFORD, 1984), isso porque ocorre na maioria dos casos na forma subclínica. Porém, dependendo da taxa de parasitemia e infecções concomitantes, situações adversas como estresse, imunossupressão e danos físicos, pode

resultar na doença clínica e até mesmo óbito (BANETH & WEIGLER, 1997; RUBINI *et al.*, 2006; KUBO *et al.*, 2006).

3.4.4 Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae é caracterizada por bactérias intracelulares obrigatórias, constituído por três gêneros principais: *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* (DUMLER *et al.* 2001). Alguns estudos avaliaram a presença de espécies dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* em animais silvestres por imunofluorescência indireta (IFA) em um puma de vida livre que apresentou anticorpos para *Ehrlichia canis* (FILONI *et al.* 2006), bem como por análise molecular, que detectou uma nova variante genotípica do gênero *Ehrlichia* em onças-pintadas de vida livre (WIDMER, 2009), além de duas onças-pintadas do Mato Grosso reativas para *Ehrlichia* spp., porém negativas na análise molecular (ONUMA, 2014).

Além disso, André *et al.* (2010, 2012) avaliaram por análise molecular e sorológica a presença de espécies relacionadas a *E. canis* e *Ehrlichia chaffeensis*, além de *Anaplasma phagocytophilum*, em diferentes felídeos de cativeiro, destacando uma onça-pintada positiva para dois genes: 16S rRNA e omp-1 para *E. canis*. Em 2018, Mazzotti *et al.* avaliaram uma alta positividade para *Anaplasma platys* em felinos silvestres de cativeiro, alguns apresentavam coinfeção por *A. phagocytophilum* ou *E. canis*; além disso, dois felinos apresentaram alterações no hemograma como anemia severa e trombocitopenia, porém devido à ausência de pesquisa para detecção de outros patógenos, não foi associado a coinfeção como causa dos achados clínicos.

3.4.5 Hemoplasma

Anteriormente descritos como *Haemobartonella* ou *Eperythrozoon*, os micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas, parasitam a superfície dos eritrócitos podendo causar severas anemias e sinais clínicos, principalmente quando associados a fatores que comprometem o sistema imune, como o estresse (MESSICK, 2004). Três espécies de hemoplasmas parasitam felinos, possuindo diferentes graus de patogenicidade: *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (SANTOS *et al.*, 2009). O principal entre eles é a espécie *M. haemofelis* (MESSICK *et al.*, 1998). Furtado *et al.* (2018) descreveram a primeira detecção de hemoplasmas em onças-pintadas de vida livre, onde a maior

ocorrência foi de ‘*C. M. haemominutum*’. Anteriormente, André *et al.* (2011) detectaram em felídeos silvestres de cativeiro a presença de ‘*C. M. haemominutum*’.

3.4.6 Gênero *Bartonella*

Os felídeos são importantes reservatórios de *Bartonella*, principalmente *Bartonella henselae*, um agente zoonótico de distribuição mundial, conhecido como causador da doença da arranhadura do gato (DAG) (CHOMEL *et al.*, 2010). A ocorrência de *Bartonella* é observada em uma variedade de felinos silvestres como: leões (MOLIA *et al.*, 2004), guepardos (KELLY *et al.*, 1998; PRETORIUS *et al.*, 2004), em lincos e pumas (YAMAMOTO *et al.*, 1998; ROTSTEIN *et al.*, 2000; CHOMEL *et al.*, 2004). A presença de anticorpos para *B. henselae* em *P. onca* foi observada por Yamamoto *et al.* (1998) em um indivíduo cativo em um zoológico da Califórnia. Filoni (2006) relatou 95% de prevalência de *B. henselae* em 20 amostras de pequenos felídeos de vida livre, sendo a maior prevalência descrita na literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

As amostras do presente estudo (n=22) são provenientes do Refúgio Ecológico Caiman (REC), localizado no município de Miranda, no Pantanal Sul-mato-grossense. Com aproximadamente 53.000 hectares, o REC dedica-se à criação extensiva de gado de corte (zebuínos), hotelaria e ecoturismo de observação de onças-pintadas e outros animais ameaçados.

4.2 Ética

O material utilizado no presente estudo foi destinado ao Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde obteve aprovação para realização do projeto perante a Comissão de Pesquisa Veterinária (COMPESQ UFRGS) n°: 38198, onde a avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) não se aplica, uma vez que o laboratório não trabalha com animais vivos.

Em contrapartida, o projeto Onçafari possui autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) licença n°: 42093-1, além de respeitar o manejo dos indivíduos de acordo com os procedimentos éticos e o bem-estar dos animais (SIKES *et al.*, 2011). Além disso, a parceria realizada entre a Associação Onçafari e ProtozooVet foi firmada em um termo de concordância assinada pelo médico veterinário responsável pelo projeto (ANEXO A).

4.3 Capturas

As capturas são realizadas de forma periódica para trabalho de monitoramento e ecologia do projeto de conservação (Onçafari), onde assim foi possível o fornecimento de amostras biológicas para o presente estudo.

As capturas foram realizadas de forma aleatória. As áreas foram previamente monitoradas por câmeras *traps* para avaliar o tráfego dos indivíduos no local. Para a contenção física (captura), foi utilizada a técnica de laço (FRANK *et al.*, 2003). Os locais de instalação eram escolhidos entre os pontos de maiores registros de onças-pintadas que apareciam nas câmeras. O local era preparado com a armadilha e um

transmissor de VHF acoplado ao mecanismo para emitir um sinal, que era acompanhado a cada hora pela equipe de campo. Todas as armadilhas eram revisadas presencialmente entre oito e nove horas da manhã, quando eram fechadas. Entre as 17 e 18 horas da tarde as armadilhas eram reabertas.

Quando os felinos eram capturados pela armadilha, havia uma mudança no sinal emitido e a equipe se dirigia ao local em 30 minutos. Era confirmada a presença de onças-pintadas e com o auxílio de um dardo de rifle de CO₂ contendo uma combinação de 5 mg/kg de tiletamina-zolazepam (Telazol® 500 mg, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) utilizado por via intramuscular (POOLE *et al.*, 1993; ONUMA *et al.*, 2015), os indivíduos foram sedados para a realização dos procedimentos que incluíam a coleta de parâmetros biométricos, avaliação clínica, colocação de rádio colar e coleta de materiais biológicos.

4.4 Amostras

No período de outubro de 2013 a janeiro de 2019 foram coletadas 22 amostras de 19 indivíduos diferentes utilizadas no presente estudo, incluindo amostras de recaptura (n=3) no REC.

Durante a sedação dos indivíduos foram coletadas amostras de sangue em tubos de coleta com anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetracético tetrassódico) (n=18) e sem anticoagulante (n=4); foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Panótico Rápido® (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil) (n=12) e coleta de ectoparasitos para identificação. Em 12 das 22 capturas, foi possível a realização da determinação do hematócrito pela técnica de microhematócrito (JAIN, 1993) por centrífuga manual por rotações durante 10 minutos. O valor de referência utilizado foi conforme Widmer *et al.* (2012). Além do hematócrito, a avaliação das mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC), pesagem e temperatura retal da maioria dos indivíduos foi avaliado.

4.5 Processamento das amostras

4.5.1 Extração de DNA e análise dos esfregaços sanguíneos

Do total de amostras (n=22), 18 foram coletadas em tubos EDTA. O volume de 200 µL para extração de DNA foi processado utilizando kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), conforme as

recomendações do fabricante. O restante das amostras (n=4), coletadas apenas em tubos sem anticoagulante (coágulos), foram processadas em um disruptor de células (L-Beater 6, Loccus[®], Melbourne, FL, USA) para melhor aproveitamento do material e posteriormente, seguiu-se utilizando o mesmo kit comercial e protocolo de extração de DNA. Amostras que continham aproximadamente 200 ng/μL de DNA determinado em um espectrofotômetro (NanoDrop[™]) foram utilizadas ou tiveram o volume ajustado.

Foi realizada uma leitura minuciosa em busca de morfologias compatíveis com hemocitozoários intracelulares e extracelulares em lâminas de esfregaços sanguíneos. Para isso, a avaliação microscópica foi realizada sempre pelo mesmo operador em aumentos de 100x, 400x e 1000x.

4.5.2. Ectoparasitos coletados

Foram contabilizados e identificados conforme chaves dicotômicas específicas segundo Barros-Battesti (2006) para carrapatos em nível de gênero. Espécies do gênero *Amblyomma* foram identificadas de acordo com Onofrio *et al.* (2006). Para bernese e miíases, a chave utilizada foi conforme Berne *et al.* (2009).

4.6 Análise molecular (Ensaio de Reação em Cadeia Polimerase/PCR)

4.6.1 PCR: Protozoários

A compilação dos *primers* utilizados no presente estudo está apresentada na tabela 2.

4.6.1.1 Ordem Piroplasmida

Para amplificação do gene 18S rRNA da Ordem Piroplasmida foi realizado o protocolo para triagem por meio dos *primer forward (pf)* BAB143-167 (5' CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA 3') e *primer reverse (pr)* BAB694-667 (5' GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG 3'), desenhado para amplificar aproximadamente 500 pb, descrito por Soares *et al.* (2011).

As amostras positivas na PCR de triagem para piroplasmas foram submetidas ao teste com *primers* específicos para *C. felis* e, para esta reação, um par de *pf* e *pr* que amplificam um fragmento de 284 pb do gene 18S rRNA foi utilizado: 5'

GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3' e 5' CCAATTGATACTCCGGAAAGAG-3', conforme descrito por Birkenheuer *et al.* (2006).

4.6.1.2 Família Trypanosomatidae

Para amplificação do gene 18S rRNA da família Trypanosomatidae, o seguinte protocolo foi utilizado como triagem, conforme Maia da Silva *et al.* (2004), por meio dos *pf* 609 5' CACCCG CGGTAATTCCAGC 3' e *pr* 706 (5' TTGAGGTTACAGTCTCAG 3'), desenhados para amplificar aproximadamente 900 pb.

Amostras positivas nesta reação foram retestadas com *primers* específicos para a detecção de *T. evansi*, com *pf* e *pr*, que amplificam um fragmento de 205 pb do fragmento RoTat 1.2 Variable Surface Glycoprotein (VSG): 5'-GCGGGGTGTTTAAAGCAATA-3' e 5'-ATTAGTGCTGCGTGTGTTTCG-3', conforme descrito por Claes *et al.* (2004).

4.6.1.3 Gênero *Hepatozoon*

Para amplificação do gene 18S rRNA do gênero *Hepatozoon*, o protocolo utilizado foi conforme Almeida (2011), por meio dos *pf* Hep2-169 (5' GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC 3') e *pr* Hep2-718 (5' ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG 3'), desenhado para amplificar aproximadamente 409 pb.

Tabela 2: Listagem das sequências dos primers *forward* e *reverse* (respectivamente) utilizados para os protozoários analisados no presente estudo, os pares de base que amplificam e suas respectivas referências.

Agentes	Gene	Sequências	pb*	Referência
Piroplasmida	18S	BAB143-167 5' CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA 3' BAB694-667 (5' GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG 3'	500	Soares <i>et al.</i> (2011)
<i>Cytauxzoon felis</i>	18S	5' GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3' 5' CCAATTGATACTCCGGAAAGAG-3'	284	Birkenheuer <i>et al.</i> (2006)
Trypanosomatidae	18S	609 (5' CACCCG CGGTAATTCCAGC 3' 706 (5' TTGAGGTTACAGTCTCAG 3'	900	Maia da Silva <i>et al.</i> (2004)
<i>Trypanosoma evansi</i>	VSG ¹	5'-GCGGGGTGTTTAAAGCAATA-3' 5'-ATTAGTGCTGCGTGTGTTTCG-3'	205	Claes <i>et al.</i> (2004)
<i>Hepatozoon</i>	18S	Hep2-169 5' GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC 3' Hep2-718 5' ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG 3'	409	Almeida (2011)

pb*= pares de base amplificados.

¹= Variable Surface Glycoprotein

4.6.2 PCR: Hemoplasma e α -proteobactérias

Na tabela 3 é possível observar a compilação de dados dos *primers* utilizados no presente estudo.

4.6.2.1 Hemoplasma

Para amplificação do gene 16s rRNA de hemoplasmas, foi utilizado protocolo descrito por Criado-Fornelio *et al.* (2003) para triagem, seguindo os *primers* HBT F 5' ATACGGCCCATATTCCTACG 3' e HBT R 5' TGCTCCACCACTTGTTC A 3', que amplifica a região entre 595 e 620 pb.

Posteriormente, as amostras positivas na triagem foram retestadas no protocolo específico de PCR Real Time para pesquisa de *Mycoplasma haemofelis* de acordo com Peters *et al.* (2008).

4.6.2.2 Família Anaplasmataceae

Para triagem da família Anaplasmataceae os pares de *primers* do gene 16S rRNA EHR16SF 5' GGTACCYACAGAAGAAGTCC3' e EHR16SR 5' TAGCACTCATCGTTTACAGC 3' foram utilizados para amplificar um fragmento de 345 pb, segundo Inokuma *et al.* (2000) no primeiro teste. Posteriormente, os *primers* que amplificam 360 pb do gene 16s rRNA, foram utilizados para uma segunda triagem, conforme descrito por Breitschwerdt *al.*, (1998): GE2 5' GTTAGTGGCATAACGGGTGAAT 3' e HE3 5' CTTCTATAGGTACCGTACATTATCTTCCCTAT 3'.

Outro gene foi avaliado para detectar possíveis espécies de *Ehrlichia* silvestres não amplificadas nos genes e *primers* anteriormente mencionados, para isso, o protocolo do gene DSB descrito por Doyle *et al.* (2005) para PCR Real Time foi modificado para PCR convencional, com isso foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: volume final de 12,5 μ L contendo 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M de cada primer, 1.5 U de *PlatinumTM Taq DNA Polymerase* (Invitrogen TM, Carlsbad, CA, EUA) e 1 μ L de DNA extraído; as condições no termociclador foram de 95°C por 5 minutos e 35 ciclos repetidos de 94°C por 40 segundos, 59°C por 40 segundos, 72°C por 1 minutos e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os *primers* amplificam 378 pb: DSB 321 5' TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA 3' e DSB 671 5' GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA 3'.

4.6.2.3 Gênero *Bartonella*

Dois genes para pesquisa do gênero *Bartonella* foram utilizados no presente estudo: *ftsZ* e *gltA*. Para amplificação de 515 pb do gene *ftsZ*, o protocolo conforme Paziewska *et al.* (2011), com os *pf* 5' CATATGGTTTTTCATTACTGCYGGTATGG 3' e *pr* 5' TTCTTCGCGAATACGATTAGCAGCTTC 3' foi utilizado. Para o gene *gltA* foi utilizado os *primers* Bhcs F 5' GGGGACCAGCTCATGGTGG 3' e Bhcs R 5' AATGCAAAAAGAAGCAGTAAACA 3' que amplificam 360 pb, conforme Norman *et al.* (1995).

4.6.3 PCR: Amplificação das reações e eletroforese

Em todas as reações mencionadas anteriormente, um controle positivo dos gêneros e controle negativo com água ultrapura UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizados. As amplificações foram realizadas em um termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystem®, Foster City, CA, EUA). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, posteriormente visualizados em um transiluminador LED Kasvi® (São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Tabela 3: Sequências dos primers *forward* e *reverse* (respectivamente) utilizados para as análises de bactérias no presente estudo, os pares de base que amplificam e suas respectivas referências.

Agentes	Gene	Sequências	pb**	Referência
Anaplasmataceae	16S	EHR16SF 5' GGTACCYACAGAAGAAGTCC 3' EHR16SR 5' TAGCACTCATCGTTTACAGC 3'	345	Inokuma <i>et al.</i> (2000)
Anaplasmataceae	16S	GE2 F 5' GTTAGTGGCATAACGGGTGAAT 3' H3 R 5' CTTCTATAGGTACCGTACATTATCTTCCCTAT 3'	360	Breitschwerdt <i>et al.</i> (1998)
Ehrlichia DSB	DSB	DSB F 321 5' TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA 3' DSB R 671 5' GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA 3'	378	Doyle <i>et al.</i> (2005) modificado para este estudo
Hemoplasma	16S	HBT F 5' ATACGGCCCATATTCCTACG 3' HBT R 5' TGCTCCACCACTTGTTCA 3'	595-620	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2003)
Mycoplasma haemofelis	16S	5' F GTGCTACAATGGCGAACACA 3' 5' R TCCTATCCGAACTGAGACGAA 3' Probe: TaqMan 5'FAM-TGTGTTGCAAACCAGCGATGGT-BHQ13'	80	Peters <i>et al.</i> (2008)
Bartonella	ftsZ	F 5' CATATGGTTTTTCATTACTGCGYGGTATGG 3' R 5' TTCTTCGCGAATACGATTAGCAGCTTC 3'	515	Paziewska <i>et al.</i> (2011)
	gltA	Bhes F 5' GGGGACCAGCTCATGGTGG 3' Bhes R 5' AATGCAAAAAGAACAGTAAACA 3'	360	Norman <i>et al.</i> (1995)

pb**= pares de base amplificados.

5 RESULTADOS

As tabelas 4 e 5 compilam os resultados finais das análises moleculares de protozoários, hemoplasma e α -proteobactérias testados em todos os indivíduos.

5.1 Análise molecular: protozoários

Todas amostras (n=22) foram positivas para a Ordem Piroplasmida. Em seguida, todas as amostras foram testadas para *C. felis* obtendo novamente 100% de positividade (n=22) (Tabela 4). Destacam-se as onças-pintadas recapturadas positivas em todas as coletas: “PO1” com amostras de 2014, 2017 e 2018 e “PO11” com amostras de 2017 e 2018.

As amostras positivas para o gênero *Hepatozoon* totalizaram 50% (11/22), incluindo a onça-pintada “PO1” positiva nas amostras de 2014 e 2018. Todas amostras apresentaram banda única com fragmento de tamanho esperado.

Quanto às amostras triadas nos *primers* da família Trypanosomatidae, 22 delas apresentaram banda de tamanho esperado (900 pb), assim como, múltiplas bandas. Posteriormente, foi realizado o teste com *T. evansi* onde cinco amostras (22,72%) obtiveram resultado positivo com banda única com tamanho de fragmento esperado (205 pb).

Três onças apresentaram coinfeção por *C. felis*, *Hepatozoon* sp. e *T. evansi*: PO1 (recaptura 2018), PO10 e PO17.

Tabela 4: Resultados individuais das análises moleculares com diferentes *primers* para pesquisa de hemoprotozoários. (continua)

N^o1	ID²	Ano de Coleta	Gênero	Piroplasmida	<i>Cytauxzoon felis</i>	Trypanosomatidae	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Hepatozoon</i>
1	PO1	2014	F	+	+	+	-	+
2		2017		+	+	+	-	-
3		2018		+	+	+	+	+
4	PO2	2017	F	+	+	+	-	-
5		2018		+	+	+	-	+
6	PO3	2013	F	+	+	+	-	+
7	PO4	2016	F	+	+	+	-	-
8	PO5	2016	F	+	+	+	-	+
9	PO6	2016	F	+	+	+	-	-
10	PO7	2016	M	+	+	+	-	+
11	PO8	2016	M	+	+	+	-	+
12	PO9	2016	F	+	+	+	-	-
13	PO10	2017	M	+	+	+	+	+

(conclusão)

N ^{o1}	ID ²	Ano de Coleta	Gênero	Piroplasmida	<i>Cytauxzoon felis</i>	Trypanosomatidae	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Hepatozoon</i>
14	PO11	2017	M	+	+	+	-	-
15	PO12	2017	F	+	+	+	+	-
16	PO13	2017	F	+	+	+	-	-
17	PO14	2017	F	+	+	+	-	+
18	PO15	2017	F	+	+	+	+	-
19	PO16	2018	F	+	+	+	-	+
20	PO17	2018	F	+	+	+	+	+
21	PO18	2019	F	+	+	+	-	-
22	PO19	2019	F	+	+	+	-	-

¹: número total de amostras.

²: número de identificação do indivíduo.

5.2 Análise molecular: hemoplasma e α -proteobactérias

Todas as amostras foram positivas para hemoplasma, mais uma vez, as onças-pintadas recapturadas “PO1” com amostras de 2014, 2017 e 2018 e “PO11” com amostras de 2017 e 2018 foram positivas em todas as coletas (Tabela 5).

Todas amostras positivas na triagem para hemoplasma foram testadas para *M. haemofelis* em PCR Real Time, destas 31,81% (7/22) obtiveram resultados específico para presença de *M. haemofelis*.

Quanto a Anaplasmataceae (gene 16s rRNA), o primeiro teste obteve resultado inespecífico com diversas bandas (*primers* EHR), portanto, o segundo teste com *primers* GE2-HE3 foi realizado obtendo negatividade em todas as amostras. Para que a possibilidade de ocorrência de *Ehrlichia silvestres* fosse confirmatória, o teste com o gene DSB foi realizado e todas as amostras foram negativas.

Quanto aos testes para pesquisa do gênero *Bartonella*, todas as amostras foram negativas nas reações dos dois genes estudados no presente estudo.

Tabela 5: Resultados individuais das análises moleculares com diferentes *primers* para pesquisa de α -proteobactérias. (continua)

N ^o 1	ID ²	Ano de Coleta	Gênero	Anaplasmataceae	<i>Ehrlichia</i> DSB	Hemoplasma	<i>Mycoplasma</i>	<i>Bartonella</i>	
				(EHR + GE2HE3)			<i>haemofelis</i>	<i>gltA</i>	<i>ftsZ</i>
1	PO1	2014	F	-	-	+	-	-	-
2		2017		-	-	+	-	-	-
3		2018		-	-	+	-	-	-
4	PO2	2017	F	-	-	+	-	-	-
5		2018		-	-	+	+	-	-
6	PO3	2013	F	-	-	+	-	-	-
7	PO4	2016	F	-	-	+	-	-	-
8	PO5	2016	F	-	-	+	-	-	-
9	PO6	2016	F	-	-	+	-	-	-
10	PO7	2016	M	-	-	+	+	-	-
11	PO8	2016	M	-	-	+	-	-	-
12	PO9	2016	F	-	-	+	-	-	-
13	PO10	2017	M	-	-	+	+	-	-

(conclusão)

N ^{o1}	ID ²	Ano de Coleta	Gênero	Anaplasmataceae (EHR + GE2HE3)	<i>Ehrlichia</i> DSB	Hemoplasma	<i>Mycoplasma</i> <i>haemofelis</i>	<i>Bartonella</i> <i>gltA</i>	<i>ftsZ</i>
14	PO11	2017	M	-	-	+	+	-	-
15	PO12	2017	F	-	-	+	-	-	-
16	PO13	2017	F	-	-	+	-	-	-
17	PO14	2017	F	-	-	+	+	-	-
18	PO15	2017	F	-	-	+	-	-	-
19	PO16	2018	F	-	-	+	+	-	-
20	PO17	2018	F	-	-	+	-	-	-
21	PO18	2019	F	-	-	+	+	-	-
22	PO19	2019	F	-	-	+	-	-	-

¹: número total

²: identificação do indivíduo

5.3 Avaliação clínica geral e do hematócrito

O presente estudo avaliou dados de diversas campanhas de captura de onças-pintadas realizadas (contabilizando capturas e recapturas).

Na tabela 6 os valores estão compilados a cada indivíduo (quando se aplica).

O valor de referência para o hematócrito de onças-pintadas de vida livre foi comparado conforme descrito por Widmer *et al.* (2012).

Tabela 6: Avaliação geral conforme os anos de coleta e os parâmetros de hematócrito, mucosas, tempo de preenchimento capilar, pesagem e temperatura retal dos indivíduos do presente estudo. (continua)

ID¹	Ano	Ht (%)² VR ³ : 32,6–38,3 %	Mucosas	TPC⁴	Peso/kg⁵	Temperatura retal (°C)⁶
PO1	2014	38	SA*	1	90	37,7
	2017	NA**	SA	1	100	37,7
	2018	38	SA	1,5	86,4	37,9
PO2	2017	NA	SA	1	54	41,3
	2018	40	SA	1	60,6	38,4
PO3	2013	38	SA	1	95	38,4
PO4	2016	35	SA	1	66	37,3
PO5	2016	36	SA	1	62	38,1
PO6	2016	38	SA	1,5	58	38,4
PO7	2016	NA	SA	1,5	104	38,8
PO8	2016	56	SA	1	74	37,9
PO9	2016	NA	SA	1	80	38,4
PO10	2017	NA	SA	1	NA	36,5
PO11	2017	NA	SA	1	132	38,2
PO12	2017	NA	SA	1	50,7	40
PO13	2017	NA	SA	1	68,4	40,3
PO14	2017	NA	SA	1	90	NA

(conclusão)

ID ¹	Ano	Ht (%) ²	Mucosas	TPC ⁴	Peso/kg ⁵	Temperatura retal (°C) ⁶
		VR ³ : 32,6–38,3 %				
PO15	2017	NA	SA	2	81,8	38,1
PO16	2018	38	SA	1	86,5	39
PO17	2018	42	SA	1	60	38,8
PO18	2019	41	SA	1	55	40,5
PO19	2019	45	SA	1	83,4	39

¹ Identificação de cada indivíduo.

² Porcentagem do hematócrito.

³ Valor de referência para o hematócrito de onças-pintadas de vida livre, segundo Widmer *et al.* (2012).

⁴ Tempo de preenchimento capilar.

⁵ Peso em quilograma.

⁶ Temperatura estimada em graus Celsius.

* SA= Sem alteração.

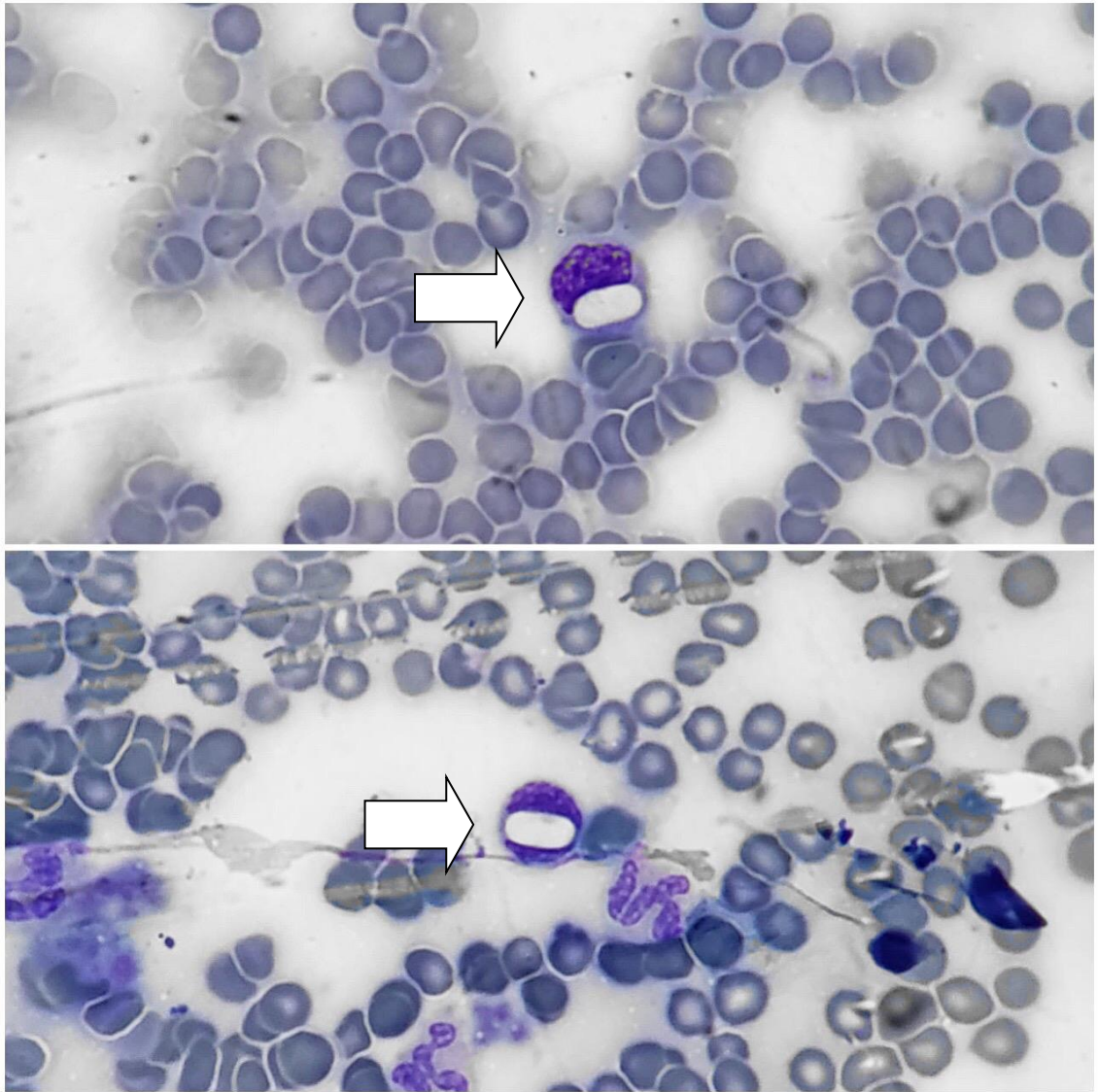
** NA= Não se aplica.

5.4 Avaliação das lâminas de esfregaço sanguíneo

No total de 12 lâminas, foi possível observar a presença de dois gamontes de *Hepatozoon* sp. em monócitos da onça-pintada “PO17” (Figura 1), positiva na análise molecular para o gênero. Na amostra de 2014 da onça-pintada “PO1” foi possível observar uma inclusão sugestiva de piroplasmas no esfregaço sanguíneo (Figura 2).

Não foram observadas formas tripomastigotas do gênero *Trypanosoma* nos esfregaços sanguíneos de nenhum indivíduo positivo na análise molecular, assim como, de nenhum outro parasito avaliado no presente estudo, além dos mencionados anteriormente.

Figura 1: Presença de gamontes de *Hepatozoon* sp. em monócitos da onça-pintada "PO17" (seta).



Fonte: autora.

Figura 2: Presença de inclusão sugestiva de piroplasma em neutrófilo na onça-pintada "PO1/2014".



Fonte: autora

5.5 Identificação dos ectoparasitos

Todos os indivíduos estavam parasitados por carrapatos no momento da captura ou recaptura. Ao todo foram identificados 454 carrapatos de diferentes espécies em 17 exemplares de onças-pintadas diferentes.

Foi registrado o parasitismo por carrapatos nas onças-pintadas “PO2/2018” (recaptura), “PO8” e “PO19”, porém estes não foram enviados para identificação.

A espécie que se sobressaiu nas identificações foi *Amblyomma sculptum* 35,68% (Figura 4), seguido de *Amblyomma ovale* 18,28% (Figura 3), *Rhipicephalus microplus* 11,68% (Figura 5), 30,18% ficaram apenas em nível de gênero *Amblyomma* devido à presença em estágio de ninfa e serão identificadas posteriormente e 4,18% *Amblyomma* em estágio de larva.

Na tabela 7 é possível observar a quantidade de carrapatos e respectivas espécies coletadas em cada indivíduo.

Tabela 7: Identificação individual dos carrapatos coletados das onças-pintadas do presente estudo. (continua)

ID¹	Ano²	Fêmea	Macho	Ninfa	Larva
PO1	2014	1 <i>A. ovale</i>	1 <i>A. sculptum</i>	3 <i>Amblyomma</i>	-
		3 <i>A. sculptum</i>		sp.	
	2017	4 <i>A. ovale</i> ³	-	-	-
		1 <i>A. sculptum</i> ⁴			
2018	5 <i>A. ovale</i>	3 <i>A. ovale</i>	42	-	
	4 <i>A. sculptum</i>		<i>Amblyomma</i>		
			sp.		
PO2	2017	2 <i>A. ovale</i>	20 <i>A. ovale</i>	-	-
		1 <i>A. sculptum</i>			
	2018	NA*	NA	NA	NA
PO3	2013	8 <i>A. sculptum</i>	11 <i>A. sculptum</i>	-	-
PO4	2016	2 <i>A. ovale</i>	-	17	-
				<i>Amblyomma</i>	
				sp.	
PO5	2016	2 <i>A. ovale</i>	1 <i>A. ovale</i>	11	16
		3 <i>R. microplus</i> ⁵		<i>Amblyomma</i>	<i>Amblyomma</i>
				sp.	sp.
PO6	2016	3 <i>A. ovale</i>	-	21	3 <i>Amblyomma</i>
		3 <i>R. microplus</i>		<i>Amblyomma</i>	sp.
				sp.	
PO7	2016	5 <i>R. microplus</i>	1 <i>A. ovale</i>	10	-
				<i>Amblyomma</i>	
				sp.	
PO8	2016	NA	NA	NA	NA
PO9	2016	1 <i>A. ovale</i>	30 <i>A. sculptum</i>	22	-
		10 <i>A. sculptum</i>	20 <i>R. microplus</i>	<i>Amblyomma</i>	
		2 <i>R. microplus</i>		sp.	

(conclusão)

ID ¹	Ano ²	Fêmea	Macho	Ninfa	Larva
PO10	2017	3 <i>A. sculptum</i>	10 <i>A. sculptum</i>	3 <i>Amblyomma</i> sp.	-
PO11	2017	13 <i>A. sculptum</i> 8 <i>R. microplus</i>	8 <i>A. sculptum</i> 10 <i>R. microplus</i>	-	-
PO12	2017	-	1 <i>A. sculptum</i>	-	-
PO13	2017	1 <i>A. ovale</i> 3 <i>A. sculptum</i>	20 <i>A. ovale</i> 20 <i>A. sculptum</i>	2 <i>Amblyomma</i> sp.	-
PO14	2017	2 <i>A. ovale</i> 13 <i>A. sculptum</i>	10 <i>A. ovale</i> 9 <i>A. sculptum</i>	-	-
PO15	2017	1 <i>R. microplus</i>	-	4 <i>Amblyomma</i> sp.	-
PO16	2018	1 <i>A. ovale</i> 1 <i>A. sculptum</i>	1 <i>A. ovale</i> 5 <i>A. sculptum</i> 1 <i>R. microplus</i>	-	-
PO17	2018	1 <i>A. sculptum</i>	3 <i>A. ovale</i> 1 <i>A. sculptum</i>	1 <i>Amblyomma</i> sp.	-
PO18	2019	3 <i>A. sculptum</i>	2 <i>A. sculptum</i>	1 <i>Amblyomma</i> sp.	-
PO19	2019	NA	NA	NA	NA
TOTAL:		110	188	137	19

¹ Identificação dos animais.² Ano de captura.³ *Amblyomma ovale*.⁴ *Amblyomma sculptum*.⁵ *Rhipicephalus microplus*.

NA* Houve o registro da presença de carrapatos, porém não foram contados ou identificados.

Figura 3: *Amblyomma ovale* macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.



Fonte: autora

Figura 4: *Amblyomma sculptum* macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.



Fonte: autora

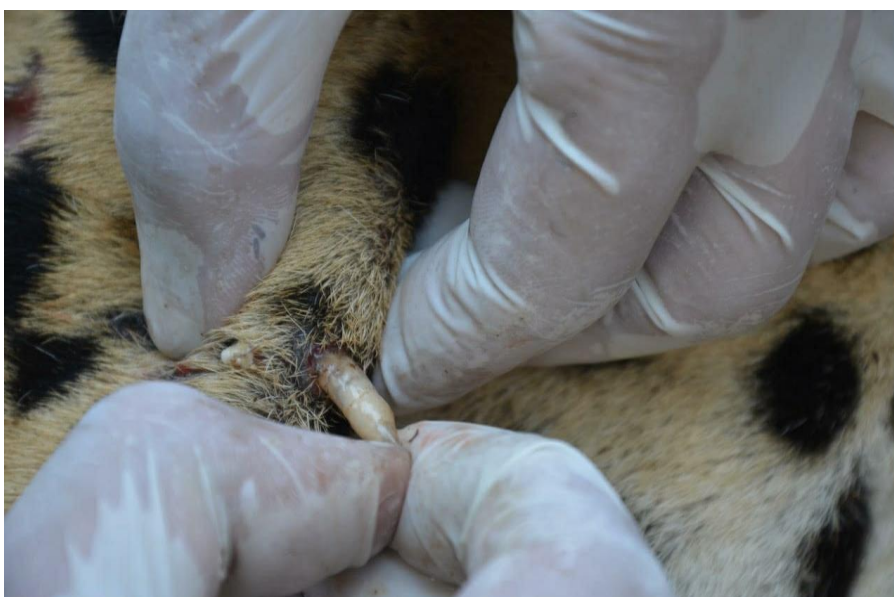
Figura 5: Identificação de *Rhipicephalus microplus* macho encontrado parasitando onças-pintadas do presente estudo.



Fonte: autora

A presença de larvas de *D. hominis* (berne) também foi registrada em seis indivíduos (6/22): PO7 (2016), PO10, PO11, PO12, PO 14 e PO15 (todos em 2017) (Figura 6).

Figura 6: Retirada por compressão manual de uma larva de *Dermatobia hominis* em uma onça-pintada do presente estudo.



Fonte: autora.

6 DISCUSSÃO

A importância do conhecimento sobre a ocorrência de agentes, vetores e a ecologia das doenças em determinadas populações ou biomas é fator chave para medidas de conservação de espécies silvestres. Para planos de ação de conservação isto pode ser desafiador, visto que em países com ampla biodiversidade como o Brasil, as diferenças entre os vetores que ocorrem em uma população e os agentes que estes transmitem podem gerar lacunas na implementação de projetos de conservação e planos de ação. Este é o caso da ocorrência de *Rickettsia* do grupo febre maculosa no Rio Grande do Sul, onde não há circulação do vetor reconhecido *A. cajennense*, sendo observado o envolvimento da espécie *Amblyomma tigrinum* (WECK *et al.*, 2016), assim como, no sudeste onde há envolvimento da espécie *A. ovale* (KRAWCZAK *et al.*, 2016).

No presente estudo foi realizada uma avaliação sanitária, não sendo possível correlacionar dados sobre vetores e os patógenos detectados, uma vez que a maior parte dos indivíduos estavam infectadas ou coinfectadas por diferentes agentes, bem como, apresentavam altas taxas de infestação por duas espécies do gênero *Amblyomma*.

6.1 Protozoários

6.1.1 *Cytauxzoon felis*

Conforme sugerido por André *et al.* (2009), Widmer (2009) e Furtado *et al.* (2017), as onças-pintadas podem atuar com reservatórios de *C. felis* no ambiente; o presente estudo relatou 100% de positividade nas análises moleculares para *C. felis*, incluindo recapturas em diferentes anos (n=22), sendo mais uma forte evidência que estes indivíduos sejam reservatórios, uma vez que nenhum animal apresentou alterações clínicas ou no hematócrito, mesmo estando coinfectado por outros parasitos e infectado em diferentes anos (PO1 2014-2017-2018).

Furtado *et al.* (2017) e Widmer (2009) também observaram 100% de positividade em onças-pintadas de vida livre no bioma Pantanal (22 e 10 indivíduos, respectivamente), e quanto a possíveis alterações, Furtado *et al.* (2017) observaram um indivíduo que apresentava baixo escore corporal devido provavelmente à idade avançada, fora isto, nenhum outro indivíduo apresentava sinais clínicos; Widmer (2009)

observou duas onças-pintadas com mucosas levemente pálidas, porém todas foram consideradas em boas condições.

Onuma (2014) relatou 10 onças-pintadas do Mato Grosso positivas para *C. felis*, todas clinicamente saudáveis, apesar de uma vir a óbito após 45 dias da captura, não sendo possível relacionar o óbito com o parasitismo.

Diferente do observado nos EUA, onde *Lynx rufus* de vida livre apresentou sinais clínicos e achados de necropsia semelhantes à cytauxzoonose em felinos domésticos (NIETFELD & POLLOCK, 2002), acredita-se que 40% dos lincos americanos apresentem sinais clínicos ou óbito em decorrência de *C. felis* (GREENE, 2006), apesar de serem considerados hospedeiro reservatório natural.

Outros casos fatais da doença ocorreram em animais de cativeiro como tigre (GARNER *et al.*, 1996) e leões em um zoológico no Brasil (PEIXOTO *et al.*, 2007). O vetor do agente no Brasil permanece desconhecido, uma vez que os carrapatos conhecidos como vetores de *C. felis* nos EUA não ocorrem no Brasil (BLOUIN *et al.*, 1984; REICHARD *et al.* 2009).

Furtado (2010) observou uma ampla abundância de espécies de carrapatos nas onças-pintadas positivas para *C. felis*, como *A. cajennense sensu lato*, *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. triste* e *R. microplus*, em diferentes biomas como Amazônia, Cerrado e Pantanal, semelhantes às espécies relatadas no presente estudo; Peixoto *et al.* (2007) identificaram a presença de *A. cajennense* em um dos casos fatais de cytauxzoonose em leões de um zoológico no estado do Rio de Janeiro, porém não foi possível afirmar que a infecção foi em decorrência deste carrapato, uma vez que, o hematozoário não foi encontrado na hemolinfa ou nos cortes histológicos dos carrapatos coletados do indivíduo e do recinto.

Assim como os relatos anteriores, não foi possível relacionar a positividade por *C. felis* e as espécies de carrapatos identificadas no presente estudo. Porém, à positividade nas recapturas em dois indivíduos, é indicado que possa haver reinfecção constante dos indivíduos no ambiente que habitam ou há uma infecção por longos períodos, característico da família Theileriidae (BARNET, 1968).

Considerando os fatos aqui apresentados, a infecção por piroplasmas deve ser avaliada com cautela perante felinos neotropicais, uma vez que o estresse também é fator apontado como desencadear de patogenias, seja ele relacionado à deficiência nutricional (MUNSON *et al.*, 2018), alterações no ambiente ou climáticas (VALE *et al.*,

2015), altos níveis de parasitismo, coinfeções e translocações (MCCULLOCH & ACHARD, 1969; WOODFORD *et al.* 1994). Na África foram observados casos de morte súbita de rinocerontes coinfectados por *Theileria bicornis* e *Babesia bicornis*, principalmente durante manejos e translocações (NIJHOF *et al.* 2003). Millán *et al.* (2007) também ressaltam que translocações, reintroduções e contato de felinos silvestres com gatos domésticos e ferais devem ser avaliadas como fonte adicional de infecção.

6.1.2 *Trypasonoma evansi*

T. evansi é enzoótico no bioma Pantanal (NUNES *et al.*, 1993), ocorrendo nas formas aguda (AQUINO *et al.*, 1999) e crônica (HERRERA *et al.*, 2002); neste bioma, um estudo avaliou a ocorrência do parasito em capivaras, roedores, marsupiais, tatus e morcegos, sugerindo que os animais silvestres positivos neste bioma participem da manutenção do agente no ambiente (HERRERA *et al.* 2004).

Estudos anteriores demonstraram que alterações hematológicas (principalmente hematócrito) e bioquímicas são frequentemente observadas em quatis (SILVA *et al.*, 1999; HERRERA *et al.*, 2001, 2002) e capivaras (FRANKE *et al.*, 1994b) naturalmente e experimentalmente infectados por *T. evansi*. Tarello (2005) observou mucosas pálidas e diminuição da temperatura corporal em um gato doméstico naturalmente infectado por *T. evansi*. Os indivíduos positivos no presente estudo não apresentaram alterações nas mucosas e na temperatura corporal. Da Silva *et al.* (2009) observou experimentalmente que gatos domésticos nos primeiros sete dias de infecção pelo parasito apresentavam diminuição significativa no hematócrito e, posteriormente, os valores permaneciam dentro da referência, isso deve-se possivelmente pela diminuição da parasitemia; isto pode ajudar a explicar o porquê que apesar da coinfeção nas onças-pintadas positivas no presente estudo a avaliação clínica e hematócrito permaneceram sem alterações, bem como a não detecção em esfregaço sanguíneo.

Apesar de haver um registro de *T. evansi* em *P. onca* (SINHA *et al.*, 1973), este se deu apenas por caracterização do gênero em esfregaço sanguíneo, sugerindo ser *T. evansi* pelo uso de uma medicação profilática em um indivíduo doente no mesmo zoológico que obteve a cura. Este trabalho traz, portanto, o primeiro relato por detecção molecular da infecção por *T. evansi* em cinco onças-pintadas de vida livre no bioma Pantanal, assim como na América do Sul.

6.1.3 Gênero *Hepatozoon*

Baneth *et al.* (2013) sugeriu que a espécie predominante que infecta felinos domésticos e silvestres seja *H. felis*, porém a infecção por *H. canis* (JITTAPALAPONG *et al.*, 2006) e *Hepatozoon silvestris* (HODŽIĆ *et al.*, 2006; KEGLER *et al.*, 2018) é bem relatada em felinos no mundo. Recentes estudos avaliaram a capacidade de *A. cajennense* (*sensu lato*), *A. ovale* e *R. sanguineus* como vetores de *Hepatozoon canis* (RUBINI *et al.*, 2009; DEMONER *et al.*, 2013), estes estudos observaram que *A. ovale* pode servir como potencial vetor de *Hepatozoon canis* em áreas rurais e silvestres (DEMONER *et al.*, 2013).

Apesar do vetor de *H. felis* ser desconhecido, possivelmente o gênero *Amblyomma* tenha relação com as infecções em felinos silvestres. No presente estudo, 6 das 12 onças-pintadas positivas para o gênero *Hepatozoon* estavam parasitadas por *A. ovale* (46,15%). A onça-pintada “PO1”, apresentou positividade na PCR nas amostras dos anos de 2014 e 2018, tratando-se de um hematozoário com parasitemia intermitente, explica o motivo pelo qual o animal não apresentou positividade no ano de 2017. Em esfregaço sanguíneo da onça-pintada “PO17”, foi observada a presença de dois gamontes de *Hepatozoon*, demonstrando possível fase aguda do protozoário (GAVAZZA *et al.*, 2003), porém o animal não apresentava sinais clínicos ou demais alterações.

A transmissão vertical de *H. canis* (MURATA *et al.*, 1993) e *H. felis* (BANETH *et al.*, 2013) também foi relatada e pode ser uma rota de infecção entre felinos silvestres. Por se tratar de animais de vida livre e topo de cadeia não é possível determinar qual a fonte de infecção. Podendo ocorrer pela ingestão de invertebrados (SMITH, 1996), por transmissão vertical ou por presas infectadas, como sugerido para algumas espécies de *Hepatozoon* (JOHNSON *et al.*, 2009), somente demonstrar que os animais do presente estudo estão expostos ao agente.

Widmer (2009), Onuma (2014) e Furtado *et al.* (2017) observaram uma alta positividade de onças-pintadas de vida livre em três biomas brasileiros, a maioria relacionada a *Hepatozoon felis*, sugerindo o papel dos indivíduos na manutenção do agente no ambiente.

6.2 Hemoplasma e α -proteobactérias

6.2.1 *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma haemofelis*

Alguns relatos demonstraram que os hemoplasmas associados principalmente a coinfeção por diferentes espécies do gênero, retrovírus ou lentivírus, doenças sistêmicas ou estresse, podem causar redução nos parâmetros hematológicos e aparecimento de sinais clínicos (WILLI *et al.*, 2006; TASKER, 2010).

Foi relatado em felinos domésticos coinfectados por *M. haemofelis*, FIV e FELV e que associações destes patógenos podem causar severas e fatais anemias (GEORGE *et al.*, 2002); em felídeos silvestres em cativeiro foi relatado uma pequena diminuição no hematócrito de indivíduos com ‘*C. M. haemominutum*’ e FIV (GHAZISAEEDI *et al.* 2017); outro estudo com gatos domésticos avaliou que *M. haemofelis* associado a ‘*C. M. haemominutum*’ pode causar anemia grave, com diminuição brusca no hematócrito (RAIMUNDO *et al.*, 2016) .

No presente estudo, a detecção de *M. haemofelis* foi de quase 32% (7/22) e não foram observadas alterações no hematócrito ou sinais compatíveis com micoplasmose foi evidenciada, assim como, não foi possível neste momento determinar qual espécie infecta os outros indivíduos ou se há coinfeção; em contrapartida, Furtado *et al.* (2018), observaram uma alta prevalência de ‘*C. M. haemominutum*’ em onças-pintadas do Pantanal. Filoni *et al.* (2012) detectou a presença de ‘*C. M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* infectando 10 felinos silvestres de cativeiro em São Paulo e nenhum indivíduo tinha alterações. Rivetti Junior (2006) avaliou por esfregaço sanguíneo a presença de *M. haemofelis* em duas onças-pintadas de cativeiro e felinos domésticos, que associou a palidez de mucosas destes felinos com a positividade para retrovírus.

Sanchioli (2015) associou o estresse de cativeiro com infecção por *M. haemofelis* em uma onça-pintada em Minas Gerais que veio a óbito, o indivíduo apresentou sinais como: anemia severa, mucosas pálidas, febre e perda de peso. Apesar de 100% de positividade no presente estudo, nenhum dos indivíduos apresentou sinais clínicos como observados por Sanchioli (2015).

Os hemoplasmas possuem diversos fatores de risco para o aparecimento de alterações em felinos domésticos ou silvestres, o estresse e a imunossupressão por outros patógenos são grandes causas de óbito entre esses animais, principalmente em relação a espécie *M. haemofelis* (GRINDEM *et al.* 1990).

Recentemente, o REC em que 19 onças-pintadas diferentes do presente estudo habitam no Pantanal, foi acometido por um grande incêndio que acometeu 60% do território do refúgio. Apesar de todas as onças-pintadas não terem se ferido, a inalação de fumaça, a perda de fauna (presas) e flora (habitat) foram grandes impactos até o momento. Com isso, ressalta-se a importância de monitorar todos os indivíduos para que toda alteração após a queimada de 2019 seja avaliada como diferencial com base nos achados do presente estudo.

6.2.2 Anaplasmataceae

Assim como Onuma (2014), o presente estudo não detectou a presença de agentes da família Anaplasmataceae em onças-pintadas, apesar de ser realizado testes com três diferentes pares de *primers*.

Widmer *et al.* (2011) detectou duas amostras positivas de onças-pintadas do Pantanal, sendo uma positiva no gene 16S rRNA para *Ehrlichia*, porém não foi sequenciada, e outra com 80,7% de similaridade com *Ehrlichia ruminantium* no gene DSB, com isso uma nova cepa erliquial foi descrita como *Ehrlichia* sp. strain Jaguar; no mesmo estudo nenhuma das duas foi positiva na sorologia para *E. canis* e outros quatro indivíduos obtiveram sorologia positiva para *E. canis* e resultado negativo na PCR convencional. Portanto, talvez se faça necessário a aplicação de técnicas sorológicas para detectar possíveis contatos dos indivíduos com os agentes da família Anaplasmataceae.

6.2.3 Gênero *Bartonella*

Guimarães *et al.* (2010) relataram a primeira detecção molecular de *B. henselae* em *P. onca*, segundo os autores, o indivíduo estava há uma semana em cativeiro e sugerem que a infecção tenha ocorrido em vida livre.

A presença do gênero *Bartonella* por sorologia foi observada em indivíduos de cativeiro (YAMAMOTO *et al.* 1998), além do mais, felídeos silvestres são sugeridos como reservatório de *B. henselae* no ambiente (FILONI *et al.*, 2006). Assim como no presente estudo, André (2012) não detectou positividade em onças-pintadas de cativeiro na PCR Real Time para o gênero, pela baixa bacteremia, sugere-se que a extração de DNA proveniente da cultura da bactéria aumente a sensibilidade das reações moleculares (BREITSCHWERDT *et al.*, 2010).

Visto que em felinos domésticos a transmissão se dá pela pulga *C. felis felis* (CHOMEL *et al.*, 1996), não foi observado o parasitismo por nenhuma pulga nos indivíduos do presente estudo, assim como, em todas as onças-pintadas do REC.

6.3 Ectoparasitos identificados

Os carrapatos identificados no presente estudo como *Amblyomma* sp., *A. ovale*, *A. sculptum* e *R. microplus* são relatados parasitando onças-pintadas em diferentes localidades (ARAGÃO & FONSECA, 1961; SINKOC *et al.*, 1998; LABRUNA *et al.*, 2005; WIDMER, 2009; FURTADO, 2010; MARTINS, 2014) (Tabela 1).

Em 2013, Beati *et al.* reavaliaram o status taxonômico do complexo *Amblyomma cajennense* onde foi dividido em seis espécies distintas, com isso destacam-se: *A. cajennense* (*sensu stricto*) predominantemente no bioma Amazônia e zonas de transição e *A. sculptum* no bioma Pantanal, Cerrado e Caatinga (MARTINS *et al.*, 2016); porém o relato de *A. cajennense* por Widmer (2009) e Furtado (2010) no bioma antecede está redescrição, o que explica os relatos da espécie em onças-pintadas do Pantanal.

A. ovale é frequentemente identificado em animais silvestres e domésticos no Pantanal e está relacionado principalmente a carnívoros (CANÇADO *et al.* 2017), sendo um importante vetor de *Hepatozoon canis*. No período de outubro de 2013 a janeiro de 2019, apenas estas duas espécies do gênero *Amblyomma* foram identificados parasitando onças-pintadas, sendo um forte indício que provavelmente *C. felis* possa ser transmitido por *A. ovale* ou *A. sculptum*, porém mais estudos são necessários.

Além do mais, possivelmente a transmissão de hemoplasmas em felinos ocorra por *C. felis felis* (WILLI *et al.*, 2007), porém no mesmo período nenhuma onça-pintada foi observada parasitada por pulgas, não podendo descartar o envolvimento de carrapatos nesta transmissão e outras rotas de infecção.

A presença de *R. microplus* parasitando os indivíduos demonstra a circulação de onças-pintadas em áreas de criação de bovinos, considerando tanto o Pantanal quanto o REC possuem como base a pecuária sustentável.

A presença de miíases furunculares (bernes) em animais domésticos e silvestres é frequentemente relatada (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 1998; VEROCAI *et al.*, 2010), além de se tratar de uma zoonose (BHANDARI *et al.*, 2007); é responsável por grandes perdas econômicas na criação de bovinos, onde estima-se que 100 milhões de bovinos estejam em risco dos efeitos de *D. hominis* (GRISI *et al.*, 2014); com a quantidade de animais servindo como reservatório e a aproximação de onças-pintadas com bovinos, torna-se necessário a

averiguação do parasitismo por *D. hominis* e demais míases em populações ameaçadas. Os indivíduos do presente estudo foram parasitados principalmente entre abril e setembro de 2017, onde a região do MS apresentava ondas de calor e chuvas intensas segundo dados oficiais (CEDEC – MS, 2017; CEMTEC – MS, 2017), essa associação de fatores segundo Pinto *et al.* (2002) são importantes no aumento de larvas de *D. hominis*. A presença de bernes em onças-pintadas também pode ser considerada porta de entrada para míases biontófagas, sendo um agravo na conservação de indivíduos vulneráveis.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados serão repassados a projetos de conservação de onças-pintadas no Brasil para que estes possam atribuir as avaliações eco-epidemiológicas de diferentes parasitos no manejo e monitoramento de indivíduos em vida livre ou que serão reintroduzidos em diferentes áreas e/ ou biomas.

Quanto aos patógenos relatados no presente estudo, destaca-se novamente a primeira detecção molecular de *T. evansi* em onças-pintadas de vida livre, bem como, mais uma forte evidência do importante papel das onças-pintadas na manutenção de *C. felis* no ambiente em que habitam. Ressalta-se também que a presença de diferentes espécies de hemoplasmas em onças-pintadas do Pantanal deve ser reavaliada.

O estudo também demonstra que apesar da infestação por ectoparasitos e a coinfeção por hemoparasitos, em alguns casos em diferentes anos, nenhum indivíduo apresentou alterações clínicas ou físicas, bem como, no hematócrito que sugerem comprometimento fisiológico devido ao parasitismo.

Após o estresse ocasionado pelas queimadas no REC, os achados do presente estudo devem ser considerados como diferencial para todas as alterações que possam ser observadas nos indivíduos, necessitando assim continuidade nas pesquisas sobre circulação de patógenos em populações vulneráveis.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. A.; TABOR, G. M. Global Factors Driving Emerging Infectious Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, n. 1, p. 1–3. 2008.

AGUIRRE, A.A. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites & Vectors**, Basel, v. 2, p. 1-8, mar. 2009.

ALMAZAN, C. *et al.* Black-Legged ticks (*Ixodes scapularis*) on the jaguar (*Panthera onca*). **The Southwestern Naturalist**, v. 58, n. 1, p. 126–127. 2013.

ALMEIDA, A.P. **Survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia* *Hepatozoon* and *Leishmania* in free-living crab-eating fox (*Cerdocyon thous*)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

ANDERSEN, E W. Control of the *Dermatobia hominis* in Central America. **Veterinary Record**, v. 74, p. 784-786, 1962.

ANDRÉ, M.R. **Deteção molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária/ Patologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

ANDRÉ, M.R. *et al.* Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **The Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023. 2010.

ANDRÉ, M.R. *et al.* Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of wildlife diseases**, v. 45, n.1, p. 234-237. 2009.

ANDRÉ, M.R. *et al.* Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 247-253. 2012.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. **The Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p. 342-347. 2011.

AQUINO, L.P.C.T. *et al.* Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.255-260, 1999.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843. 1936.

AVERBECK, G. A. *et al.* Prevalence of haematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) on Serengi National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. **The Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, p. 392-282, 1990.

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

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, p. 365-370, 1997.

BARNET. Theileriasis. *In: The pathogens, the infections, and the consequences diseases caused by Protista*. WEINMAN, D.; RISTIC, M. (eds). Cambridge: Academic press, 1968.

BARRETT, M.P.; CROFT, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175-196, 2012.

BARROS-BATTESTI D.M. *et al.* 2006. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.

BHANDARI, R.; JANOS, D.P.; SINNIS, P. Furuncular myiasis caused by *Dermatobia hominis* in a returning traveler. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 598-599, 2007.

BIRKENHEUER, A.J. *et al.* Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. **Veterinary parasitology**, v. 137, p.144-149. 2006.

BLOUIN, E. F. *et al.* Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 3, p. 241-242, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, 1998.

BREITSCHWERDT, E.B. *et al.* Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

BRINKERHOFF, R.J. *et al.* Are carnivores universally good sentinels of plague? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n.5, p. 491–497, oct. 2009.

BROCKLESBY, D. W. *et al.* *Babesia* species of the leopard (*Panthera pardus*) and its transmission to the domestic cat (*Felis catus*). Progress in Protozoology. 177-178p. **International Conference on Protozoology II**. International Congress Series, n. 91, Amsterdam: Excerpta Medica, 1965.

CANÇADO, P. H. D. *et al.* Current status of ticks and tick-host relationship in domestic and wild animals from Pantanal wetlands in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 107, supl. e2017110, 2017.

Centro de Monitoramento do Tempo e do Clima de MS (CEMTEC), Mato Grosso do Sul. **Estação de outono em MS em 2017**. CEMTEC, Campo Grande – MS, 17 mar. 2017.

CHOMEL, B. B. *et al.* Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1952-1956, 1996.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p.743-50, Sep. 2010.

CHOMEL, B. B. *et al.* Seroprevalence of Bartonella infection in American free-ranging and captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). **Veterinary Research**, v. 35, p. 233-241, 2004.

CLAES, F. *et al.* Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 3, n. 1, p. 3-7. 2004.

CRIADO-FORNELIO *et al.* New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93-99, 2006.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.* Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology** v. 93, p. 307-317, 2003a.

Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC), Mato Grosso do Sul. **Previsão do tempo em MS em 2017**. CEDEC, Campo Grande – MS, 16 set. 2017.

CUPP, E.W. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p.1-25. 1991.

DA SILVA, A. S. *et al.* *Trypanosoma evansi*: Hematologic changes in experimentally infected cats. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 31–34, 2009.

DALL'AGNOL, B. *et al.* *Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa. **Transboundary and Emerging Diseases**, Hoboken, v. 65, n. 2, p. 224–230, nov. 2017.

DE SOUZA, V. K. *et al.* Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. **Parasitology Research**, v. 118, n.4, 1337-1342, apr. 2019.

DE VOS, A.J.; POTGIETER, F.T. Bovine babesiosis. *In*: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (ed). **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Cape Town: Oxford University Press. p. 278–294, 1994.

DEMONER, L. *et al.* Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 6, p. 542-546, 2013.

DESQUESNES, M. *et al.* Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. **Veterinary Parasitology**, v.162, p. 214–220, 2009.

DESQUESNES, M. *et al.* *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. **BioMed Research International**, p. 1–20, 2013.

DOYLE, C.K. *et al.* Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taqman Real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, p.504-510, 2005.

DUMLER J.S. *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145- 2165. 2001.

DURDEN, L.A. *et al.* Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 189-193, 2006.

ECHEVERRIA, J.T. *et al.* Clinical and therapeutic aspects of an outbreak of canine trypanosomiasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 320-324, Apr. 2019.

ECKERLIN, R.P. Fleas (Siphonaptera) of the Yucatan Peninsula (Campeche, Quintana Roo, and Yucatan), Mexico. **Caribbean Journal of Science**, v. 41, n. 1, p. 152-157. 2005.

ESTRADA-PENA, A. Tick-borne pathogens, transmission rates and climate change. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2674. 2009.

FILONI C. *et al.* Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 166-173. 2012.

FILONI, C. *et al.* First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470- 477. 2006.

FORNAZARI, F. *et al.* Leptospira reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205–212, feb. 2018.

FRANK, L. *et al.* Foot snares: An effective method for capturing African lions. **Wildlife Society Bulletin**, v. 31, p. 309–314. 2003.

FRANKE, C. R.*et al.* Monitoring of clinical, parasitological and serological parameters during an experimental infection of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) with *Trypanosoma evansi*. **Acta Tropica**, v. 58, n. 2, p. 171–174, 1994.

FUENTE, J. de la. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6938. 2008.

FURTADO, M. M.; FILONI, C. Diseases and their role for jaguar conservation. **Cat News**, v. 4, p. 35-40. 2008.

FURTADO, M. M. *et al.* First detection of feline hemoplasmas in free-ranging jaguars (*Panthera onca*). **Veterinary Microbiology**, v. 214, p. 75-80, Feb. 2018

FURTADO, M.M. **Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de onça-pintada e animais domésticos em áreas preservadas de três biomas brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia.** 2010. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FURTADO, M.M. *et al.* Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil? **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 4, p. 470-476. 2017.

GARNER, M. M. *et al.* Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). **Veterinary pathology**, v. 33, n. 1, p. 82-86, 1996.

GAVAZZA, A. *et al.* Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 154, p. 565-571, 2003.

GEORGE, J. W. *et al.* Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1172–1178, 2002.

GHAZISAEEDI, F. *et al.* Detection and molecular characterization of feline hemoplasmas in wild felid species in Iran in the Middle East. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 54, p. 1–6, 2017.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat.** 3rd. Saint Louis: Elsevier Inc., p. 667- 736, 2006.

GRINDEM, C. B. *et al.* Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 1, p. 96-99, 1990.

GRISI, L. *et al.* . Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal , v. 23, n. 2, p. 150-156, June 2014 .

GUIMARÃES, A. M. S. *et al.* Detection of *Bartonella* spp. in neotropical felids and evaluation of risk factors and hematological abnormalities associated with infection. **Veterinary microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 346-351, 2010.

HARDER, M. *et al.* Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. **Vaccine**, v. 13, p. 521-523, 1995.

HARMSSEN, B. J. **The use of camera traps for estimating abundance and studying the ecology of jaguars (*Panthera onca*)**. 2006. Tese de doutorado (University of Southampton, Southampton, United Kingdom), 2006.

HERRERA, H. *et al.* Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta tropica**, v. 81, n. 3, p. 203–210, 2002.

HERRERA, H. *et al.* *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 209–216, 2001.

HERRERA, H.M. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263–75, 2004.

HODŽIĆ, A. *et al.* *Hepatozoon silvestris* sp. nov.: morphological and molecular characterization of a new species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). **Parasitology**, v. 144, p. 650–661, 2017.

HOGGSTRAAL, H., KAISER, M.N. Ticks from European-asiatic birds migrating through Egypt into Africa. **Science**, v. 133, p. 277-278. 1961.

HOOGESTEIJN, A.; HOOGESTEIJN, R. Cattle ranching and biodiversity conservation as allies in south america's flooded savannas. **Great Plains Research**, Lincoln, v. 20, n.1, p. 37-50, jan. 2010.

HOOGESTEIJN, R. *et al.* Jaguar predation vs. conservation: cattle mortality by felines on three ranches in the Venezuelan Llanos. *In*: DUNSTONE, N.; GORMAN,

M.L. (ed). **Mammals as predators**. Londres: Proc. Symp. Zool. Soc. Lond., 1993. P. 391-407.

HOSKINS, J.D.; CUPP, E.W. Ticks of veterinary importance. The ixodidae family: identification, behavior and associated diseases. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.10, n. 5, p. 564-580. 1988.

ICMBIO. **Plano de ação nacional para a conservação da onça-pintada**. DESDIEZ, A. *et al.* PAULA, R.C.; DESDIEZ, A.; CAVALCANTI, S. (ed) – Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, 2013.

INOKUMA, H. *et al.* Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4219-4221. 2000.

JAIN NC. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JEDRZEJEWSKI, W. *et al.* 2018. Estimating large carnivore populations at global scale based on spatial predictions of density and distribution, Application to the jaguar (*Panthera onca*). **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194719.

JITTAPALAPONG, S. *et al.*: Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 479–488, 2006.

JOHNSON, E. M. *et al.* Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1315–1318, 2009.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14. 2004.

JORGE, R.S.P. *et al.* Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n.3, p.686-710, sep. 2010.

JOSHI, P.P. *et al.* Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p. 491–5, 2005.

KEGLER, K. *et al.* Fatal infection with emerging apicomplexan parasite *Hepatozoon silvestris* in a domestic cat. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018

KELLY, P. *et al.* *Bartonella henselae* isolated from cats in Zimbabwe. **The Lancet**, v. 351, p. 1706, 1998.

KRAWCZAK, F.S. *et al.* Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p. 502–507. 2016.

KUBO, M. *et al.* Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cat. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 8, p. 833-837, 2006.

LABRUNA, M. B. *et al.* *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42 n. 1, p. 90–98, jan. 2004.

LABRUNA, M. B. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149-163. 2005.

LABRUNA, M.B. *et al.* Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v.45, p. 1156–1159. 2008.

LANE, J. R.; KOCAN, A. A. *Hepatozoon* sp infection in bobcats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 11, p. 1323, 1983.

LEAVELL, H.; CLARK, E. G. **Preventive medicine for the doctor in his community**. New York: Macgraw Hill, 1965.

LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia USP, Fapesp, 2000.

LOPES, M. G. *et al.* Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1. 2016.

LOPES, O.S.S *et al.* Emergency of a new arbovirus disease in Brasil II. Epidemiological study on 1975 epidemic. **American Journal Epidemiology**, v. 108, n. 5, p. 394-401, 1978.

LOVERIDGE, A.J. *et al.* People and wild felids: Conservation of cats and management of conflicts. *In*: MACDONALD, D.W.; LOVERIDGE, A.J. (Ed). **Biology and Conservation of wild felids**. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 161–196.

LYLES, A.M.; DOBSON, A.P. Infectious disease and intensive management: population dynamics, threatened hosts, and their parasites. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Florida, v. 24, n. 3, p. 315–326, sep. 1993

MACDONALD, D.W. Dangerous liasons and disease. **Nature**, London, v. 379, p. 400–401, feb. 1996.

MACHADO, A. B. M. *et al.* **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente, Fundação Biodiversitas, 2008. 2 v.

MAIA DA SILVA F. *et al.* 'Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences'. **Parasitology**, n. 129, p. 549–561. 2004.

MARTINS, T. F. 2014. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. Tese (Doutorado Epidemiologia Experimental Aplicada) - Universidade de São Paulo, 2014.

MARTINS, T. F. *et al.* Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.

MASSI PALLARÉ'S, R.; BENI'TEZ USHER, C. A. De la distribución de Ixodina (Vander Hammen, 1968) en el Paraguay. **Revista Paraguaya de Microbiología**, v.17, p. 49–52. 1982.

MAY JUNIOR, J. A. *et al.* Mercury content in the fur of jaguars (*Panthera onca*) from two areas under different levels of gold mining impact in the Brazilian Pantanal. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 2129–2139, aug. 2018.

MAZZOTTI, G. *et al.* . Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro , v. 38, n. 3, p. 528-535, Mar. 2018 .

MCCULLOCH, B.; ACHARD, P.L. Mortalities associated with capture, translocation, trade and exhibition of black rhinos. **International Zoology Yearbook**, v. 9, p. 184–91, 1969.

MCCULLY, R. M.; BASSON, P. A.; BIGALKE, R. D.; DeVOSS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 117-134, 1975.

MELO, A. L. T. *et al.* A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 30, n. 1. p. 112–116, oct. 2015.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential.’, **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, 2004.

MESSICK, J.B. *et al.* Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

METZGER, B. *et al.* The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 28-33, 2007.

MILLÁN, J. *et al.* Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. **Parasitology**, v. 134, n. 7, p. 995. 2007.

MISRA, K. K.; ROY, S.; CHOUDHURY, A. Biology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in experimental heterologous mammalian hosts. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 1047–1061, 2015.

MOLIA, S. *et al.*, Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 31-41, 2004.

MORATO, R.G. *et al.* Space Use and Movement of a Neotropical Top Predator: The Endangered Jaguar. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0168176. 2016.

MORATO, R.G. *et al.* Avaliação do risco de extinção da Onça-pintada (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, p. 122-132. 2013.

MÖRNER, T.; OBENDORF, D.L.; ARTOIS, M. Surveillance and monitoring of Wildlife diseases. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v. 21, p. 67-76. 2002.

MUNSON, L.; *et al.* Climate Extremes Promote Fatal Co-Infections during Canine Distemper Epidemics in African Lions. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. e2545, 2008.

MURATA, T. *et al.* Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 867–868, 1993.

MURRAY, D.L. *et al.* Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. **Animal Conservation**, London, v. 2, n. 4, p. 241-254, nov. 1999.

NIETFELD, J. C.; POLLOCK, C. Fatal Cytauxzoonosis in a Free-ranging Bobcat (*Lynx rufus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n.3, p. 607–610. 2002.

NIJHOF, A. M. *et al.* *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: Tick-Borne Parasites Associated with Mortality in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2249–2254. 2003.

NORMAN, A. F. *et al.* Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1797–1803. 1995.

NOWELL, K.; JACKSON, P. **Wild cats. Status Survey and Conservation Action Plan**. Gland: IUCN/SSC Cat Specialist Group, 1996.

NÚNCIO, M.S.; ALVES, M.J. **Doenças Associadas a Artrópodes Vetores E Roedores**. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2014.

NUNES, V.L.B. *et al.* Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no Pantanal sul-matogrossense. Estudos de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 41–44, 1993.

OLIVEIRA, T.G. **Neotropical Cats: Ecology and Conservation**. São Luis: Editora da Universidade Federal do Maranhão, 1998.

OMS, 2016. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/detail/15-03-2016-an-estimated-12-6-million-deaths-each-year-are-attributable-to-unhealthy-environments>>. Acesso em: 23 jan. 2020.

ONOFRIO, V. C. *et al.* Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*, p.53-113. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p. 2006.

ONUMA, S. S. M. **Detecção sorológica e molecular de agentes infecciosos em onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre em unidades de conservação do Pantanal matogrossense, Brasil**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Cuiabá, 2014.

ONUMA, S. S. M. *et al.* Detection of *Leptospira* spp. and *Brucella abortus* antibodies in free-living jaguars (*Panthera onca*) in two protected areas of Northern Pantanal, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 2, p. 177-180, 2015.

OSTERHAUS, A. Catastrophes after crossing species barriers. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 356, p. 791–793. 2001.

PACKER, C. *et al.* Viruses of the Serengeti: patterns of infection and mortality in African lions. **Journal of Animal Ecology**, v. 68, p. 1161–1178. 1999.

PAGE, K. *et al.* Reducing *Baylisascaris procyonis* roundworm larvae in raccoon latrines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 90–93. 2011.

PAROLA, P. *et al.* Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719–756, 2005.

PAVLOVSKY, E. N. **Natural nidity of transmissible diseases**. Illinois: University of Illinois Press, Urbana and London, 1966.

PAYAN, E.; DE OLIVEIRA, T. *Leopardus tigrinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, London, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T54012637A50653881.en>. Acesso em 22 Jan 2020.

PAZIEWSKA, A. *et al.* Recombination within and between species of the Alpha Proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. **Microbial Ecology**, New York, v. 61, n. 1, p. 134- 145, 2011.

PEIXOTO, P.V. *et al.* Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.145, n. 3-4, p. 383-387. 2007.

PETERS, F.B. *et al.* Caça preventiva ou retaliativa de felinos por humanos no extremo sul do Brasil. In: CASTAÑO-URIBE, C.; LASSO, C.A.; HOOGES-TEIJN, R.; DIAZ-PULIDO, A.; PAYÁM, E. (ed.). **Conflictos entre felinos y humanos en América Latina**. Bogotá: Instituto Humboldt Colombia, p. 489. 2016.

PETERS, I. R. *et al.* The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 142–150. 2008.

POOLE, K. G. *et al.* Chemical immobilization of lynx. **Wildlife Society Bulletin (1973-2006)**, v. 21, n. 2, p. 136-140, 1993.

POWAR, R.M. *et al.* A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, p. 72–4, 2006.

PRETORIUS, A. M. *et al.* *Bartonella henselae* in African lion, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 2257- 2258, 2004.

QUIGLEY, H. *et al.* *Panthera onca* (errata version published in 2018). **The IUCN Red List of Threatened Species**, London, 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en>. Acesso em: 22 jan. 2020.

RAIMUNDO, J. M. *et al.* Hematological changes associated with hemoplasma infection in cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 441–449, 2016.

RAINA, A. K. *et al.* Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 67–69. 1985.

RAWLINS, S.C. *et al.* Applewhaite, Screwworm (Diptera: Calliphoridae) Myiasis in the Southern Caribbean, and Proposals for Its Management. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n.5, p. 1106-111, oct. 1983.

REICHARD, M.V. *et al.* Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 110-115. 2009.

REIS, N. R. *et al.* **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Editora Universidade Federal de Londrina, 2006.

RIVETTI JUNIOR, A. V. 2006. **Retrovíroses, *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma haemofelis* em gatos errantes e felinos selvagens do Zoológico de Belo Horizonte-MG.** Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

RODRIGUES, A. *et al.* Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

ROELKE-PARKER, M. E. *et al.* A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 441–445. 1996.

ROTSTEIN, D. S. *et al.* Prevalence of *Bartonella henselae* antibody in Florida panthers. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, p. 157-160. 2000.

RUBINI, A. S. *et al.* Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 324-327, 2009.

RUBINI, A. S. *et al.* Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 168-171, 2006.

SANCHIOLI, R. G. Micoplasmose hemotrópica felina em onça-pintada (*Panthera onca*): relato de caso. **Biotemas**, v. 28, n. 2, p. 153-156, 2015.

SANDERSON, E. *et al.* Planning to save a species: the jaguar as a model. **Conservation Biology**, Washington, v. 16 n. 1, p. 58-72, feb. 2002.

SANTOS, A.P. *et al.* Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p.443-452, 2009.

SEYMOUR, K. *Panthera onca*. **Mammalian species**, v. 340, p. 1-9. 1989.

SIKES, R. S.; GANNON, W. L. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. **Journal of mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 235-253, 2011.

SILVA-JÚNIOR, V.P.; LEANDRO, A.; MOYA-BORJA, G.E. Ocorrência do Berne, *Dermatobia hominis* (Diptera: Calliphoridae) em vários hospedeiros, no Rio de Janeiro, **Brasil. Parasitol Dia**, v. 22, p. 97-101, 1998.

SIMBERLOFF, D. Flagships, umbrellas, and keystones: Is single-species management passé in the landscape era? **Biological Conservation**, v. 83, n. 3, p. 247–257, march. 1998.

SINHA, P. K.; MUKHERJEE, G. S.; DAS, M. S.; LAHIRI, R. K. Outbreak of *Trypanosoma evansi* among tigers and jaguars in Calcutta. **Indian Veterinary Journal**, v. 46, p. 306-310. 1971.

SINKOC A.L. *et al.* Ixodidae parasitos de animais silvestres na região de Foz do Iguacu, Brasil e Argentina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, p. 29–33. 1998.

SIVAJOTHI, S. *et al.* Prevalence of *Trypanosoma evansi* in domestic animals in Rayalaseema region of Andhra Pradesh in India. **Journal of Animal Science Advances**, v. 5, n. 10, p. 1449–1456, 2016.

SIVAJOTHI, S.; REDDY, S. B. *Trypanosoma evansi* infection in a cat—a rare case. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 115–116, 2017.

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

SOARES, J.F. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 203-208. 2011.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R.M. Overview, Ticks, people and animals. **Tick biology**, v. 1, p. 3-16. 2014.

SUNQUIST, M.; SUNQUIST, F. **Wild cats of the world**. Chicago: University of Chicago press, 2002.

SWANK, W. G.; TEER, J. G. Status of jaguar. **Oryx The International journal of conservation**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 14-21, apr. 1989.

SZABÓ, M. P. J. *et al.* Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v.3, n.27, p. 1-9, July. 2013.

TARELLO, W. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, p. 133–134, 2005.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, n. 5, p. 369-381, 2010.

TELFORD, S. R. Haemoparasites of reptiles. *In: Diseases of amphibians and reptiles*. Springer, Boston, MA, 1984.

TENSEN, L. Biases in wildlife and conservation research, using felids and canids as a case study. **Global Ecology and Conservation**, v. 15, p. 1-10, July. 2018.

TIPTON, V.J.; MÉNDEZ, E. The fleas (Siphonaptera) of Panama. *In: WENZEL, R.L.; TIPTON, V.J. (Ed). Ectoparasites of Panama*. Chicago: Field Museum of Natural History, p. 289–385, 1966.

TRIGO, T. C. *et al.* Carnívoros Continentais. *In: WEBER, M.M.; ROMAN, C.; CÁCERES, N.C. (Ed.). Mamíferos do Rio Grande do Sul*. Santa Maria: Editora UFSM, 2013a.

TRIGO, T. C. *et al.* Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. **Current Biology**, Maryland Heights, v. 23, n. 24, p. 2528 – 2533, dec. 2013b.

TRIGO, T.C. *et al.* Geographic distribution and food habits of *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* (Carnivora, Felidae) at their geographic contact zone in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 48, n. 1, p. 56-67, mar. 2013c.

UPADHYE, S.V.; DHOOT, V.M. Trypanosomiasis in a tiger (*Panthera tigris*). **Zoo's Print Journals**, v. 15, p. 326, 2000.

VALE, M.; LORINI, M.; CERQUEIRA, R. Neotropical wild cats susceptibility to climate change. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 63-88. 2015.

VEROCAI, G. G. *et al.* Furuncular myiasis caused by the human bot-fly *Dermatobia hominis* in a domestic cat from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 6, p. 491–493, 2010.

WAGNER, J. E. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 168, n. 7, p. 585-588, 1976.

WECK, B. *et al.* Spotted fever group *Rickettsia* in the Pampa biome, Brazil, 2011–2015. **Emerging Infectious Diseases journal**, Atlanta, v. 22, n.11, p. 2014-2016, nov. 2016.

WIDMER, C. E. *et al.* Tick-Borne Bacteria in Free-Living Jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, 2011.

WIDMER, C. E. *et al.* Hematology and Serum Chemistry of Free-ranging Jaguars (*Panthera onca*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 4, p. 1113–1118, 2012.

WIDMER, C.E. **Perfil sanitário de onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre no Pantanal Sul do Mato Grosso do Sul - Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WILLI, B. *et al.* Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, 2007.

WILSON, K. A. *et al.* Conservation Research Is Not Happening Where It Is Most Needed. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 14, n. 3, p. 1-5, mar. 2016.

WOODFORD, M. H.; ROSSITER, P. B. Disease risks associated with wildlife translocation projects. In: **Creative conservation**. Springer: Dordrecht, 1994.

YAMAMOTO, K. *et al.* *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 56–63. 1998.

ZELLER, K.A. **Jaguars in the new millennium data set update: the state of the jaguar in 2006**. New York: Wildlife Conservation Society, 2007.

ZIMMERMANN, A. *et al.* Cattle ranchers' attitudes to conflicts with jaguar *Panthera onca* in the Pantanal of Brazil. **Oryx**, v. 39, n.4, p. 406-412. 2005.

**ANEXO A**

Universidade Federal do Rio
Grande do Sul Faculdade de
Veterinária



Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais

TERMO DE CONCORDÂNCIA

Eu, Joares Adenilson May Júnior, portador do CPF nº XXX.XXX.XXX-XX, vinculado a Universidade do Sul de Santa Catarina, Panthera Brasil, Onçafari Association, Instituto Pró Carnívoros e GICS Internation Member, concordo em conceder amostras de sangue, tecidos, fezes e ectoparasitos de indivíduos da espécie *Panthera onca*, que venham a ser capturados durante as atividades dos projetos de pesquisa e conservação realizados em diferentes localidades do Brasil, para o Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para futuras colaborações na área de pesquisa e possíveis produções bibliográficas vinculadas a pesquisas com bactérias relacionadas a hemoparasitoses e com protozoários em mamíferos. As amostras biológicas somente poderão ser utilizadas para os fins descritos no projeto para qual foi solicitada. As amostras ou parte delas não poderão ser utilizadas para outra finalidade, nem repassadas para outros laboratórios sem consentimento das partes envolvidas.

Tubarão, 25 de outubro de 2019.



MV. M^e. Joares Adenilson May Júnior Professor
Universidade do Sul de Santa Catarina, Panthera Brasil,
Onçafari Association,
Instituto Pro Carnívoros, GICS International Member

Av. Bento Gonçalves, 9090 – Porto Alegre, RS CEP
91.540-000
Email: protozoovet@gmail.com.

(A assinatura foi parcialmente ocultada para garantir a segurança do portador.)