

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA - PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

Pesquisa de infecções por Agentes Anaplasmataceae,
Piroplasmas e Hemoplasmas em gambás-de-orelha-preta
(*Didelphis aurita*) da região metropolitana do Rio de
Janeiro

Ágatha Ferreira Xavier de Oliveira

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS
CLÍNICAS)**

**PESQUISA DE INFECÇÕES POR AGENTES ANAPLASMATACEAE,
PIROPLASMAS E HEMOPLASMAS EM GAMBÁS-DE-ORELHA-PRETA
(*Didelphis aurita*) DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

ÁGATHA FERREIRA XAVIER DE OLIVEIRA

Sob a Orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Medicina
Veterinária**, no Curso de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária
(Patologia e Ciências Clínicas)

Seropédica, RJ
Novembro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48p Oliveira, Ágatha Ferreira Xavier, 1993-
Pesquisa de infecções por Agentes Anaplasmataceae,
Piroplasmas e Hemoplasmas em gambás-de-orelha-preta
(Didelphis aurita) da região metropolitana do Rio de
Janeiro / Ágatha Ferreira Xavier Oliveira. - Rio de
Janeiro, 2021.
41 f.

Orientadora: Cristiane Divan Baldani.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária, 2021.

1. Marsupiais. 2. Hemoparasitas. 3. Biologia
Molecular. 4. Coinfecção. 5. Medula óssea. I. Divan
Baldani, Cristiane, 1978-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
graduação em Medicina Veterinária III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

AGATHA FERREIRA XAVIER DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas

TESE APROVADA EM 29/11/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC.

Identificar membros da banca:

Dra. CRISTIANE DIVAN BALDANI, UFRRJ
(Orientador / Presidente da Banca)

Dr. MARCOS ROGERIO ANDRE, UNESP

Dra. MARISTELA PECKLE PEIXOTO, UFRRJ

Dr. DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR, UFRRJ

Dra. ANDRESA GUIMARÃES, INMA



Emitido em 2022

TERMO Nº 149/2022 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 09:26)

CRISTIANE DIVAN BALDANI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matricula: 2572430

(Assinado digitalmente em 23/02/2022 06:48)

DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matricula: 2318733

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 09:38)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: 3103478

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 11:21)

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 302.435.148-59

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 09:07)

ANDRESA GUIMARÃES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 116.295.977-08

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
149, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **20/02/2022** e o código de verificação: **bb1d315343**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer Àquele que é digno, pela dádiva da vida, principalmente em tempos tão remotos. Sem Ele eu nada seria, pois é Ele quem me sustenta, me guarda e me impulsiona a sempre seguir em frente. Obrigada Senhor!

Aos meus pais *Lilian, André* e ao meu irmão *Guilherme*, por todos os ensinamentos, orações e carinho que recebi ao longos desses anos. À minha avó *Cleli* e minha prima *Nathália* por estarem sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos de dificuldade. Aos meus afilhados *Micaela* e *Aarão*, pelo amor inexplicável de ser dinda. Amo intensamente vocês. Em especial ao *Caio*, pelo cuidado, amor e companheirismo que me fazem caminhar sem medo. Você me inspira. Obrigada por tanto!

À minha orientadora, *Prof.^a Dra. Cristiane Divan Baldani* que desde a minha graduação sempre acreditou em mim, investindo tempo e muitos ensinamentos. Sou extremamente grata a tudo que fez no âmbito profissional, mas principalmente pelo apoio e suporte num dos momentos que mais precisei, nunca irei me esquecer. A sua trajetória me inspira!

Aos meus companheiros de laboratório *Naiara, Alexandre* e *Elisabeth* pelos momentos de muito trabalho e também muita diversão. Vocês são maravilhosos, e sempre estarei torcendo por cada um. À ex aluna de iniciação científica *Ana Beatriz*, que sempre foi muito prestativa, não tenho dúvidas que será uma profissional incrível, torço muito por você! À *Dra. Andresa Guimarães* e *Dra. Juliana Macedo* por me ensinarem as primeiras lições sobre biologia molecular. Vocês são maravilhosas, desejo o melhor e muito sucesso. Ao *Prof.^o Dr. Huarrisson Azevedo*, por disponibilizar o *Laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ* para processamento das amostras.

Ao *CETAS-RJ* e ao *CRAS-RJ* por me abrirem as portas, permitindo a elaboração desta dissertação. Ao *Prof.^o Dr. Daniel Balthazar* e *Prof.^o Jeferson Pires* pela enorme ajuda ao projeto. E principalmente à *Anieli*, que foi essencial em todas as etapas das coletas. Vocês são os melhores veterinários de silvestres desse Brasil. Gratidão!

À *Dra. Gracy Marcello*, por me ensinar a coleta e o processamento de medula óssea nos animais. Você me inspira como profissional e ser humano, serei eternamente grata por tudo. Ao *Prof.^o Dr. Marcos Rogério André*, *Prof.^a PhD Rosangela Zacarias* e *MsC Ana Calchi*, além de toda a equipe que compõe o *Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP - Jaboticabal* por toda ajuda primordial neste trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada pela disponibilidade, paciência e incrível recepção! Às meninas da república de Jaboticabal, que muito bem me receberam durante minha estadia. Torço pelo sucesso de cada uma!

À *Prof.^a Dra. Maristela Peixoto* e ao *Prof.^o PhD Carlos Massard* pelo auxílio nas fotografias microscópicas dos agentes patogênicos identificados. Obrigada pela enorme ajuda!

À *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* que me permitiu vivenciar as melhores coisas desta vida. Pela formação de excelência (profissional e pessoal), ao crescimento, amadurecimento e novas perspectivas sobre a vida! Um ruralino sempre será um ruralino, gratidão!

Ao *Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, docentes e demais discentes!* Nossa jornada fisicamente distante mas virtualmente conectada será um marco na vida de todos nós! Agradeço também aos demais professores da graduação que contribuíram para minha formação, e todos os demais funcionários! Ao *Programa de Residência Multiprofissional da UFRRJ* e aos meus amigos de turma (anos 2018/2019). Vocês foram essenciais para minha formação profissional. Sinto muita saudade daquela época e guardo todos com muito carinho em meu coração.

Ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica ofertadas a mim e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio e fomento aos projetos desta dissertação.

RESUMO

OLIVEIRA, Ágatha Ferreira Xavier. **Pesquisa de infecções por agentes Anaplasmataceae, Piroplasmas e Hemoplasmas em gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. 2021. 41f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A ocorrência de hemoprotozoários em marsupiais é descrita em diversos países como o Brasil, Austrália, Estados Unidos, China, entre outros. Mudanças ambientais contribuem para o acesso destes animais a nichos ecológicos não habituais, como metrópoles e áreas periurbanas, expondo-os a diversos riscos como descargas elétricas, queimaduras, fraturas, intoxicações e ataques por cães e seres humanos. Apesar desta proximidade, são escassas as investigações quanto à participação de gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) sobre a circulação de agentes patogênicos veiculados por vetores e consequente ocorrência de doenças no Brasil. Objetivou-se com este estudo pesquisar a presença de agentes patogênicos das famílias Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae e de piroplasmas em sangue periférico e de medula óssea, bem como a existência de co-infecções em *Didelphis aurita* oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Um total de 15 gambás-de-orelha-preta foram recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres – CETAS RJ e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – CRAS RJ. Mediante contenção apropriada, os animais foram avaliados clinicamente e inspecionados quanto à presença de ectoparasitos. Além disto, amostras de sangue periférico foram colhidas através de venopunção da veia da cauda e transferidas para tubos contendo o anticoagulante EDTA, para se realizar o hemograma. A coleta de medula óssea foi realizada após sedação, em apenas dez dos quinze animais devido ao escore corporal adequado que estes possuíam. Para se evitar resultados falso-negativos, todas as amostras foram submetidas à análise molecular prévia para detecção dos genes endógenos *gapdh* e IRBP. As detecções de DNA de Agentes patogênicos pertencentes à família Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae foram baseadas no gene 16S rRNA e Piroplasmas no gene 18S rRNA. Todas as amostras de sangue total e medula óssea testadas foram negativas para a família Anaplasmataceae. Vinte por cento (3/15) dos animais foram positivos para *Mycoplasma* spp. nas amostras de sangue total, e destes, 66,6% (2/3) apresentavam comorbidades como escoriações e fraturas relacionadas a acidentes urbanos. Para a ordem Piroplasmida, 33,3% (5/15) dos animais foram positivos em amostras de sangue total e também em medula óssea e destes, 80% (4/5) apresentavam condições inflamatórias. Um dos animais positivos para Piroplasma apresentava mucosa icterica e diminuição do valor de hemoglobina corpuscular média e outro animal apresentou anemia (hematócrito de 23,5%) e diminuição do valor da proteína plasmática (5g/dl). Coinfecção por piroplasmas e hemoplasmas ocorreu em treze vírgula trinta e três por cento (2/15) dos gambás, e apenas um apresentava comorbidade. Os dados deste estudo indicam a existência de infecções por hemoparasitos de importância em *D. aurita* provenientes da região metropolitana do Rio de Janeiro, o que reforça a necessidade de novos estudos epidemiológicos que esclareçam a participação destes animais na ocorrência de doenças causadas por estes agentes patogênicos nos animais domésticos e seres humanos.

Palavras-chave: Hemoparasitoses, marsupial, medula óssea, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ágatha Ferreira Xavier. **Research of infections by Anaplasmataceae, Piropalms and Hemoplasms agents in black-eared-opossums (*Didelphis aurita*) from the Metropolitan Region of Rio de Janeiro. 2021. 41f.** Dissertation (Master of Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The occurrence of hemoprotozoa in marsupials is described in several countries such as Brazil, Australia, United States, China, among others. Environmental changes contribute to the access of these animals to unusual ecological niches, such as metropolises and peri-urban areas, exposing them to various risks such as electrical discharges, burns, fractures, poisoning and attacks by dogs and humans. Despite this proximity, there are few investigations regarding the participation of black-eared skunks (*Didelphis aurita*) on the circulation of vector-borne pathogens and the consequent occurrence of diseases in Brazil. The objective of this study was to investigate the presence of pathogens from the Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae and piropalms in peripheral blood and bone marrow, as well as the existence of co-infections in *Didelphis aurita* from the metropolitan region of Rio de Janeiro. A total of 15 black-eared opossums were received at the Wild Animal Screening Center – CETAS RJ and at the Wild Animal Rehabilitation Center – CRAS RJ. With appropriate restraint, the animals were clinically evaluated and inspected for the presence of ectoparasites. In addition, peripheral blood samples were collected by venipuncture of the tail vein and transferred to tubes containing the anticoagulant EDTA, to perform the hemogram. Bone marrow collection was performed after sedation in only ten of the fifteen animals due to the adequate body score, they had. To avoid false-negative results, all samples were submitted to previous molecular analysis for detection of endogenous *gapdh* and IRBP genes. DNA detections of pathogens belonging to the Anaplasmataceae and Mycoplasmataceae family were based on the 16S rRNA gene and Piropalms on the 18S rRNA gene. All samples of whole blood and bone marrow tested were negative for the family Anaplasmataceae. Twenty percent (3/15) of the animals were positive for *Mycoplasma* spp. in whole blood samples, and of these, 66.6% (2/3) had comorbidities such as abrasions and fractures related to urban accidents. For the Piropalms order, 33.3% (5/15) of the animals were positive in samples of whole blood and also in bone marrow and of these, 80% (4/5) had inflammatory conditions. One of the animals positive for Piropalma had icteric mucosa and decreased mean corpuscular hemoglobin value and another animal had anemia (23.5% hematocrit) and decreased plasma protein value (5g/dl). Coinfection by piropalm and hemoplasma occurred in thirteen-point thirty-three percent (2/15) of skunks, and only one had comorbidity. The data from this study indicate the existence of infections by hemoparasites of importance in *D. aurita* from the metropolitan region of Rio de Janeiro, which reinforces the need for new epidemiological studies to clarify the participation of these animals in the occurrence of diseases caused by these pathogens. in domestic animals and humans.

Key words: Bone marrow, haemoparasitosis, marsupial, molecular diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações de PCR, utilizadas para detecção molecular de Agentes patogênicos pertencentes à família Anaplasmataceae baseada no gene 16S rRNA, *Mycoplasma* spp. baseadas no gene 16S rRNA e Ordem Piroplasmida baseada no gene 18S rRNA.....
10

CAPÍTULO I

Table 1 - Description of primers, PCR product size, and references used in PCR assays for Agents Anaplasmataceae based on the 16S rRNA gene, agents of the Order Piroplasmid based on the 18S rRNA gene, and *Mycoplasma* spp. based on the 16S rRNA gene.....16

Table 2 - Hematological results of black-eared opossum infected by *Mycoplasma* spp. and piroplasms compared with reference values according to Casagrande et al. (2009)22

Table 3 - Epidemiological information, clinical aspects, and results of molecular analyzes for Agents Anaplasmataceae, *Mycoplasma* spp., and piroplasms in black-eared opossum's whole blood and bone marrow samples from the metropolitan region of Rio de Janeiro.....23

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 – Intraerythrocytic forms of piroplasms evidenced in a blood smear of a black-eared opossum that presented jaundice and intense erythrocyte anisocytosis and polychromasia. A - ring-form trophozoites, B - tetrad (Maltese cross) forms (black arrows). Optical microscopy (100x magnification). Giemsa staining.
.....21

Figure 2 - Phylogenetic position of piroplasms isolated from a Brazilian opossum based on 18S rRNA sequences (800 bp). The tree was constructed using the neighbor-joining method, and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points.....24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Gênero <i>Didelphis</i>	2
2.1.1 <i>Didelphis aurita</i>	2
2.2. <i>Didelphis</i> sp. como reservatório de agentes patogênicos.....	2
2.2.1. Família Anaplasmataceae	3
2.2.2. Ordem Piroplasmida	4
2.2.3. <i>Mycoplasma</i> spp.	5
2.3. Diagnóstico molecular.....	7
2.4 Avaliação da medula óssea em animais silvestres	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Espécies amostradas e áreas de estudo.....	8
3.2 Contenção, avaliação clínica e coleta de sangue.....	9
3.3 Análise Hematológica	9
3.4 Coleta das amostras de medula óssea.....	9
3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	10
3.5.1 Extração de DNA e verificação de gene endógeno	10
3.5.2 Reação de amplificação	10
3.5.3 PCR para bactérias da Família Anaplasmataceae.....	11
3.5.4 PCR <i>Mycoplasma</i> spp.....	11
3.5.5 PCR Ordem Piroplasmida	11
3.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose	12
3.6 Sequenciamento de Nucleotídeos.....	12
3.7 Análise Filogenética	12
3.8 Análise Estatística	12
4 CAPÍTULO - “Investigation of infection by Anaplasmataceae Agents, Piroplasmids and Hemoplasmas in peripheral blood and bone marrow samples from black-eared-opossums (<i>Didelphis aurita</i>) in the metropolitan region of Rio de Janeiro”	13
1 SUMMARY	13
2 INTRODUCTION.....	14
3 MATERIALS AND METHODS	14
3.1 Animals.....	14
3.2 Blood and bone marrow samples.....	14
3.3 Hematological analysis.....	15
3.4 DNA extraction	15
3.5 Molecular analysis	15
3.5.1 Anaplasmataceae (16S rRNA).....	15
3.5.2 Piroplasmida (18S rRNA)	15
3.5.3 <i>Mycoplasma</i> spp. (16S rRNA).....	16
3.6 Purification and sequencing	16
3.7 Phylogenetic analyses.....	16
4 RESULTS.....	17
4.1 PCR endogenous control	17

4.2 Anaplasmataceae (16S rRNA).....	17
4.3 <i>Mycoplasma</i> spp. (16S rRNA).....	17
4.4 Pyoplasמידs (18S rRNA)	17
4.5 Coinfection	17
4.6 Phylogenic Analysis	18
5 DISCUSSION	18
6 CONCLUSION	20
7 ACKNOWLEDGMENTS.....	20
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
6. ANEXOS	40
6.1 ANEXO I - Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO	40
6.2 ANEXO II – Aprovação CEUA/UNESA.....	41

1 INTRODUÇÃO

Quando se pensa na participação dos animais silvestres como reservatórios de doenças, grandes são os desafios quanto à elucidação dos aspectos epidemiológicos, principalmente de agentes infecciosos de importância Médico Veterinária e humana. Mudanças ambientais contribuem com o acesso destes animais a nichos ecológicos não habituais, como metrópoles e áreas periurbanas favorecendo a circulação de agentes patogênicos entre os animais selvagens, os animais domésticos e o homem. Dentre os principais reservatórios silvestres, também considerados animais sinantrópicos, estão os marsupiais *Didelphis* spp., popularmente conhecidos como gambás. A interação destes animais com os seres humanos é antiga, fato atrelado a sua grande capacidade de adaptação até mesmo em áreas muito devastadas. São comuns de serem encontrados nos forros das casas, troncos de árvores e outras áreas que possibilitem o acesso a restos alimentares do homem e outros animais. Devido a sua grande capacidade adaptativa, o gambá torna-se um interessante modelo de estudo animal, possibilitando investigações ecológicas, evolutivas e biológicas. A participação como reservatórios em diversas doenças ainda não é totalmente esclarecida. Sabendo-se da importância dos agentes patogênicos pertencentes à família Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae, e hematozoários do grupo dos piroplasmidas como causadores de doenças nos animais, além da existência de espécies de importância em humanos, é fundamental a investigação molecular de tais patógenos em possíveis reservatórios silvestres, dentre os quais *Didelphis* spp., que estão cada vez mais presentes em ambientes peridomiciliares. O presente estudo teve como objetivo investigar a infecção por estes agentes infecciosos em amostras de sangue periférico e aspirado de medula óssea de gambás-de-orelha preta (*Didelphis aurita*) provenientes dos Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ) e do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS-RJ), ambos localizados no estado do Rio de Janeiro, por meio de métodos moleculares, associando-os a achados clínico-laboratoriais e epidemiológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Didelphis*

Dentro da grande ordem Didelphimorphia estão inclusos grande parte dos marsupiais americanos existentes, distribuídos desde o sudeste do Canadá ao sul da Argentina (NOWAK, 1999). Quatro famílias estão inseridas nesta ordem, sendo elas: Marmosidae, Caluromyidae, Glironiidae e Didelphidae (ASTÚA, 2006).

A família Didelphidae é subdividida em duas subfamílias: Caluromyinae e Didelphinae, sendo composta atualmente por 19 gêneros e 92 espécies (EMMONS; FEER, 1997; EISENBERG; REDFORD, 1999; BROWN, 2004; GARDNER, 2005; VOSS et al., 2004a; VOSS et al., 2005; SOLARI, 2004).

Dentre os mamíferos encontrados na Mata Atlântica, 9,1% é representado por marsupiais (REIG, 1981; FONSECA et al., 1996) sendo o gênero *Didelphis* sp. amplamente distribuído em toda a Região Neotropical (ANDRADE, 2002; GARDNER, 1973). Estes representam um dos grupos mais antigos de marsupiais, sendo as principais espécies encontradas no Brasil: *D. marsupialis*, *Didelphis aurita*, *D. albiventris* e *D. imperfecta* (ANDRADE, 2002).

2.1.1 *Didelphis aurita*

A termo “gambá” originou-se do termo tupi-guarani “corruptela de guaambá” que significa ventre aberto (SANTOS, 1984; NOMURA, 1996). Os marsupiais completam o seu desenvolvimento embrionário no marsúpio, uma estrutura da pele situada na região inguinal em formato de bolsa onde localizam-se as glândulas mamárias (DELICIELLOS et al., 2006; CABRAL, 2015; JANSEN, 2002).

O gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) é um dos representantes da família Didelphidae (Marsupialia, Didelphimorphia), sendo umas das espécies de mamíferos neotropicais mais abundantes desta ordem (GARDNER, 2005).

Em relação a sua morfologia, apresentam um porte médio, com seu comprimento total entre 355 e 450 mm, uma cauda preênsil não recoberta por pelos e que mede aproximadamente 298 e 470 mm (VIEIRA 1997; SALVADOR et al., 2009).

Possuem cinco dígitos com garras pontiagudas, exceto no primeiro dedo do pé, e um peso corpóreo que varia em média 670 a 1882g, sendo as fêmeas maiores e mais leves que os machos (LANGE; JABLONSKI, 1998; PASSAMANI, 2000). O corpo é recoberto por um pelo longo de coloração escurecida com as pontas esbranquiçadas e por um subpelo denso de coloração ferrugínea (NOWAK, 1999). As orelhas são grandes, desprovidas de pelos e com coloração completamente negra e no rosto notam-se uma listra escura na frente e outras sobre cada olho (ROSSI, 2006).

Didelphis aurita possui uma dieta onívora composta por pequenos invertebrados, aves, répteis, pequenos mamíferos, frutas e sementes (ROSSI, 2006; CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2001; CÁCERES, 2004). As épocas reprodutivas e surgimento de ninhadas são mais evidentes entre os meses de outubro a janeiro, e o número de filhotes varia entre quatro a onze por ninhada (CHEREM et al., 1996; PASSAMANI, 2000).

2.2. *Didelphis* sp. como reservatório de agentes patogênicos

O termo sinantropismo é definido como um grupo de animais que se adaptaram aos ambientes urbanizados, sendo eles animais exóticos e nativos (silvestres), segundo a Instrução Normativa 141/2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (BRASIL, 2006). Estes vão possuir relação estreita com as áreas urbanas

e os indivíduos ali inseridos, ao utilizarem os recursos sinantrópicos disponíveis como ração de animais domésticos, lixo, e locais que servirão como abrigo contra predadores (BRASIL, 2006; LACERDA et al., 2010). Esta característica adaptativa vem se intensificando principalmente devido à grande expansão dos centros urbanos e incorporação das áreas periurbanas às grandes cidades devido ao intenso desequilíbrio ambiental (LACERDA et al., 2010).

Os gambás são um dos principais animais sinantrópicos observados no Brasil, e isto se deve à grande plasticidade ecológica aos mais diversos habitats (CRUZ-SALAZAR; RUIZ-MONTOYA, 2020; CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 1997; GRAIPEL; SANTOS-FILHO, 2006). À medida em que se inserem aos centros urbanos, estes animais tornam-se expostos a fatores antropogênicos como injúrias, ataques por seres humanos ou animais domésticos, estresse, atropelamentos, descargas elétricas, entre outros, levando a um aumento nas admissões nos centros de reabilitação em todo o mundo (FIGUEIREDO, 2019; TARDIEUA et al., 2020).

Por características ligadas à evolução, sabe-se que os animais selvagens atuam como reservatórios de diversas doenças de importância médico veterinária e humana (ANDRÉ, 2018). A relação parasito-hospedeiro precisa se manter equilibrada, e, portanto, grande parte destes animais não desenvolvem sintomatologia clínica mesmo ao albergarem agentes infecciosos de importância (ABU BARK, 2016; LONGDON, 2014). Isto decorre da dependência dos parasitas em obter nutrientes e abrigo para a reprodução e consequente perpetuação de sua espécie (ABU BARK 2016).

Estudos demonstram a participação de indivíduos da família Didelphidae como reservatórios de agentes infecciosos de importância em medicina humana e veterinária sendo os principais: vírus da Raiva (MALTA; LUPPI, 2007), *Leptospira* spp. (CASTRO, 2015), *Trypanosoma* spp. (GÜRTLER; CARDINAL, 2015), *Leishmania* spp. (SANTIAGO, 2007) e *Sarcocystis neurona* (LINS et al., 2011),

A incidência de doenças transmitidas por artrópodes vem crescendo ao longo dos anos de maneira significativa (LIN et al., 2021). Além disto, a proximidade de possíveis reservatórios em áreas urbanas, com destaque aos animais sinantrópicos, pode contribuir com a translocação de agentes patogênicos (SHAW et al., 2001; ROJERO-VAZQUEZ et al., 2017). Neste contexto, destacam-se os estudos em gambás como reservatórios de *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., entre outros (ABEL, 2000; KRUSE, 2004; GUIMARÃES et al., 2018; NANTES, 2019; MASSINI, 2019).

Por isto, faz-se necessário um monitoramento da presença desses organismos e seus hospedeiros mais comuns, para compreender a dinâmica da transmissão de agentes causadores de doenças, além da tomada de medidas assertivas de prevenção e controle (GOMPPER, 2014).

2.2.1. Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae é de grande importância dentro da ordem Rickettsiales, sendo formada pelos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, e ‘Candidatus Neoehrlichia’ (transmitidos por carrapatos), *Neorickettsia* (transmitida por helmintos) e *Wolbachia* (endossimbionte em invertebrado) (DUMLER et al., 2001; ESHOO, 2015; CALCHI et al., 2020).

Os membros desta família são bactérias intracelulares obrigatórias, Gram-negativas, pleomórficas e apresentam-se como pequenas granulações agregadas (mórculas) dentro de vacúolos intracitoplasmáticos (AGUIAR et al., 2014; CALCHI et al., 2020). Estes agentes patogênicos podem infectar células fagocíticas derivadas da medula óssea e células endoteliais nos hospedeiros vertebrados além das células de insetos, helmintos e tecidos reprodutivos de artrópodes (KOČÍKOVÁ et al., 2018).

Anaplasma e *Ehrlichia* são mantidas no ambiente por meio de um ciclo envolvendo vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo num hospedeiro infectado, os carrapatos fazem a ingestão das bactérias, e estas penetram nas células epiteliais

do intestino, onde realizam o primeiro ciclo de replicação. A partir deste momento, migram para as glândulas salivares do artrópode, onde realizam um segundo ciclo de replicação. Durante um próximo repasto sanguíneo ocorre a transmissão destas, perpetuando o agente no ambiente (UETI et al., 2009; RAR; GOLOVLJOVA, 2011).

Estudos em animais silvestres acerca de infecções por agentes patogênicos da família Anaplasmataceae, bem como o papel destes na propagação das infecções, crescem cada vez mais, principalmente em decorrência do aumento dos desequilíbrios ambientais (HARRUS; BANETH, 2005; ANDRÉ, 2018; CALCHI et al., 2020).

Estudos sorológicos direcionados à detecção de anticorpos contra *Ehrlichia chaffeensis* em *Didelphis virginianus* (LOCKHART et al., 1997; CASTELLAW et al., 2011) e anticorpos contra *Ehrlichia canis* em *D. aurita* e *D. albiventris* no sudeste do Brasil (MELO et al., 2016) são alguns exemplos já descritos sobre a ocorrência de infecção nestes indivíduos.

Novos genótipos de *Ehrlichia* sp. em gambás já foram detectados no Brasil por Guimarães et al. (2018) na região sudeste e Lopes et al. (2018) na região nordeste. Amostras de sangue de marsupiais presentes no Pantanal brasileiro também continham DNA dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* (DE SOUSA et al., 2017). Em mamíferos, *Ehrlichia* sp. infecta principalmente leucócitos (monócitos, macrófagos, granulócitos) e células endoteliais, glândulas salivares, epitélio intestinal e células da hemolinfa em carrapatos (COHN, 2003; ALLSOPP, 2010).

2.2.2. Ordem Piroplasmida

Piroplasmas ou piroplasmídeos são hemoprotozoários apicomplexos, incluindo os gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Rangelia* e *Cytauxzoon* (YABSLEY; SHOCK, 2013). Estes parasitos acometem animais domésticos, selvagens e até mesmo o homem, podendo cursar com sintomatologia grave e estão entre os agentes infecciosos transmitidos por carrapatos de maior prevalência (ALVARADO-RYBAK et al., 2016).

Estes agentes patogênicos são transmitidos por carrapatos, possuindo um ciclo de vida heteroxeno, com a participação de hospedeiros vertebrados (ALVARADO-RYBAK et al., 2016). O ciclo de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo, onde um carrapato infectado ao se alimentar libera esporozoítos de suas glândulas salivares. Estas formas adentram a corrente sanguínea do hospedeiro e invadem eritrócitos, quando se tratar de *Babesia* spp., e linfócitos, quando se tratar de parasitos do gênero *Theileria* spp. Estes, ainda podem ser fagocitados por macrófagos ou parasitar outras células como já observado em infecções por *Cytauxzoon* spp. e *Rangelia vitalii* (KIER et al., 1987; EIRAS et al., 2014).

Em relação ao gênero *Babesia*, a partir da infecção primária nos eritrócitos, ocorrerá uma reprodução assexuada onde os trofozoítos se dividem em merozoítos num processo denominado merogonia (fissão binária) para em seguida infectarem outros eritrócitos do hospedeiro (JALOVECKA et al., 2019).

A reprodução sexuada, também denominada fase de gametogonia, se inicia a partir do momento em que os merozoítos se diferenciam em gametócitos, que ao serem ingeridos pelo hospedeiro invertebrado são liberados em sua luz intestinal. Neste momento, os gametócitos se diferenciam em gametas e se fundem, formando um zigoto móvel, denominado oocineto. O oocineto vai penetrar a membrana semipermeável do lúmen intestinal e invadir as células locais onde sofrerão divisão meiótica, produzindo os cinetos. Estes se disseminarão pelo organismo do artrópode através da hemolinfa, infectando tecidos periféricos e células ovarianas, resultando na infecção dos ovos (transmissão transovariana). Os cinetos primários vão se multiplicar nos tecidos por meio da esquizogonia, gerando cinetos secundários que vão atingir as células das glândulas salivares do hospedeiro invertebrado (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; JALOVECKA et al., 2019).

Uma vez que os cinetos invadem as glândulas salivares, eles se desenvolvem em esporoblasto, e permanecem em latência durante a ecdise do carrapato vetor, o que garante a ocorrência da transmissão transestadial. Uma vez que o artrópode infectado inicia o repasto sanguíneo, o esporoblasto é ativado, havendo produção e liberação contínua de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo (JALOVECKA et al., 2019).

Acredita-se que os agentes patogênicos do gênero *Babesia* multiplicam-se exclusivamente no interior de eritrócitos, não sendo confirmado de forma convincente a ocorrência de uma esquizogonia. Tal fato diferencia o gênero de outros membros da ordem Piroplasmida com *Cytauxzoon* e *Theileria*, dos quais a esquizogonia já foi relatada em macrófagos e linfócitos, respectivamente (JALOVECKA et al., 2019). Piroplasmas que não são atribuídos a nenhum dos grupos mencionados são classificados como *Babesia* sensu lato, e são definidos pela ausência de esquizogonia e transmissão transovariana (SCHNITTGER et al., 2012).

Nas infecções por *Theileria* spp., com a liberação do parasito na corrente sanguínea do hospedeiro, os esporozoítos vão infectar inicialmente os leucócitos, se multiplicar por esquizogonia, e só após a liberação dos merozoítos, estes vão infectar os eritrócitos, dando continuidade ao ciclo. Além disto, a transmissão transovariana não foi observada neste gênero (NORVAL et al., 1992; MCKEEVER, 2009).

Infecções por piroplasmas podem cursar com doenças graves em animais domésticos e humanos, com sintomas relacionados à destruição eritrocítica e ao quadro inflamatório associado como febre, anemia e hemoglobinúria (YABSLEY; SHOCK, 2013).

Em grande parte dos animais selvagens a infecção é subclínica (PENZHORN, 2006), porém, quando ocorre num hospedeiro não natural, ou em indivíduos sob influência de mudanças em seu habitat, vivendo em cativeiro, sob estresse ou imunossuprimidos, sinais clínicos graves podem ser observados (MUNSON et al., 2008).

Marsupiais da família Macropodidae, que incluem os cangurus (*Macropus rufus*) também podem ser afetados pela infecção por estes organismos, demonstrando quadros de anemia, letargia e inapetência (DANAHOE et al., 2015).

Babesioses já foram reportadas em guaxinins, gambás e roedores, abrangendo diversas espécies como *Babesia microti* anteriormente denominada de *Theileria annae* (UILENBERG, 2006; NAKAJIMA et al., 2009; YABSLEY; SHOCK, 2013).

Uma infecção experimental por *Babesia bovis* em *Didelphis marsupialis* foi reportada, indicando elevação na temperatura corpórea dos animais, anorexia e diminuição do tamanho eritrocitário, além da evolução do ciclo parasitário semelhante ao que ocorre em bovinos (DE SOUZA PAIVA et al., 1991).

Na América do Sul, *Babesia brasiliensis* foi encontrada em *D. marsupialis* e *D. albiventris*, baseando-se apenas na identificação morfológica dos parasitos em esfregaço sanguíneo (DA SERRA FREIRE, 1979; HERRERA; URDANETA-MORALES, 1991).

Em outros marsupiais e monotremados australianos já foram reportadas infecções por *Theileria ornithorhynchi* (PAPARINI et al., 2015), *Theileria brachyuri*, *T. penicillata*, *T. fuliginosa* (CLARK; SPENCER, 2007) e *T. gilberti* (LEE et al., 2009).

2.2.3. Mycoplasma spp.

Hemoplasmas, também conhecidos como micoplasmas hemotróficos, são bactérias pequenas (0,3 a 0,8µM) e pleomórficas que infectam obrigatoriamente a superfície eritrocítica de seus hospedeiros (ALMOSNY; SOUZA, 2012). Não possuem parede celular, sendo esta característica utilizada na classificação dentro da Classe Mollicutes (RAZIN, YOGEV; NAOT, 1998) e que as distingue das bactérias verdadeiras (NASCIMENTO, 2000).

Inicialmente, estes organismos foram incluídos na ordem Rickettsiales devido aos aspectos morfológicos e boa resposta à antibioticoterapia (WEISS; MOULDER, 1984). Porém, com os avanços nos estudos moleculares e sequências genômicas, foi constatado que os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, como eram nomeados, estavam intimamente relacionados ao grupo de *Mycoplasma pneumoniae*, o que promoveu uma reclassificação das espécies dentro do gênero *Mycoplasma* como micoplasmas hemotróficos (NEIMARK et al., 2001; RIKIHISA et al., 1997).

Em relação à morfologia, variam de cocos únicos ou aos pares, e ocasionalmente em cadeias (NEIMARK et al., 2001) ou em formatos anelares (MESSICK et al., 2004).

Diversas espécies de hemoplasmas já foram reportadas em todos os continentes, exceto na Antártica, o que sugere uma ampla distribuição mundial dos agentes infecciosos (BIONDO et al., 2009).

Os mecanismos de transmissão natural em cães e gatos ainda não estão inteiramente elucidados. A participação de artrópodes hematófagos pode estar relacionada com a dispersão do agente, havendo altas prevalências nas regiões tropicais (MACIEIRA, 2008).

Material genético de *Mycoplasma haemofelis* foi detectado em pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, e o artrópode foi dito como possível vetor em felinos (SHAW et al., 2001; LASHNITS et al., 2019). Em carrapatos *Rhipicephalus microplus*, a detecção de 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' foi obtida nos estágios de ovos e larvas, e larvas infectadas puderam transmitir o patógeno a camundongos (SHI et al., 2019). A presença de *Mycoplasma haemocanis* em cães e em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sugere competência vetorial para este patógeno, porém melhores estudos são necessários para firmar a teoria (DO et al., 2021).

Em felinos, a transmissão através da inoculação por mordeduras e a via transplacentária também foram descritas (ALMOSNY; SOUZA, 2012).

Transfusões sanguíneas foram relatadas como fontes de infecções por *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*' (GARY et al., 2006; WILLI et al., 2006b).

A sintomatologia clínica da infecção vai depender do tropismo tecidual da espécie envolvida (MESSICK, 2004). A patogenia da infecção envolve diversos mecanismos como a produção de radicais livres pela bactéria que induzem a danos oxidativos nas membranas celulares eritrocitárias, secreção de enzimas micoplasmáticas que geram rompimento tecidual, redução de nutrientes ou precursores envolvidos na biossíntese celular, produção de autoanticorpos que desencadeiam distúrbios imunológicos, entre outros (FELDER et al., 2011; SOKOLI et al., 2013).

Infecções por *Mycoplasma* spp. já foram reportadas numa diversidade de animais selvagens ao redor do mundo (MESSICK, 2004; VOLOKHOV et al., 2017). Na fauna brasileira, hemoplasmas já foram detectados em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (VIEIRA et al., 2009), pequenos roedores (GONÇALVES et al., 2015), quatis (*Nasua nasua*) (DE SOUSA et al., 2017), javalis (*Sus scrofa*) (DIAS et al., 2019), entre outros.

Uma espécie de hemoplasma que produziu parasitemia grave com consequente anemia em um gambá norte-americano (*Didelphis virginiana*) imunossuprimido foi descrita (MESSICK et al., 2000).

A detecção de *Mycoplasma* spp. hemotrófico em sete gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) no Sul do Brasil foi reportada, e o sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA apresentou 98,97% de similaridade com sequências de 'Candidatus *Mycoplasma haemodidelphis*' já detectadas nos Estados Unidos (MASSINI et al., 2019). Gonçalves et al. (2020) ao avaliar amostras de sangue de *Didelphis albiventris* do centro-oeste brasileiro detectou uma positividade para hemoplasmas em 32,5%.

Ainda em gambás-de-orelha-branca no Brasil, uma espécie potencialmente nova foi identificada também no sul do Brasil e, baseando-se nos genes 16S rRNA e 23S rRNA, a análise

filogenética juntamente com dados epidemiológicos propôs a nomenclatura de ‘*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*’ para este novo organismo (PONTAROLO et al., 2021).

2.3. Diagnóstico molecular

Os ensaios moleculares contemplam a detecção do DNA do agente em amostras biológicas, e apesar de custosos, estão sendo cada vez mais utilizados na rotina clínica em Medicina Veterinária. A identificação e a detecção de novos agentes infecciosos, principalmente os indivíduos de difícil cultivo celular, vem sendo permitida atualmente pela utilização de sequências de oligonucleotídeos em associação ao sequenciamento genético (D’AGNONE et al., 2003).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica que se baseia na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de DNA a partir de uma fita molde, gerando diversos clones numa mesma reação (MULLIS; FALOONA, 1987). Três etapas principais estão envolvidas na técnica: desnaturação, anelamento e extensão. Inicialmente ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA pelo calor, seguida de anelamento de cada primer (senso e anti-senso) em cada fita simples. A partir disto, a enzima Taq DNA polimerase promove a extensão e polimerização da fita ao adicionar nucleotídeos (GONÇALVES, 2006).

Mundialmente, estudos demonstram a utilização de diferentes genes conservados como alvo para a detecção de agentes patogênicos da família Anaplasmataceae tais como: o gene *16S* rRNA, o gene que codifica a enzima citrato sintetase (*gltA*), o operon *groESL*, genes responsáveis por codificação de proteínas formadoras das ligações dissulfeto (*dsb*) e genes que codificam outras proteínas de superfície (OMPs) (DUMLER et al., 2001).

Para reorganizar os gêneros e espécies das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae o gene *16S* rRNA foi utilizado por Dumler et al. (2001), devido à baixa capacidade mutagênica e alta conservação em diferentes populações e regiões geográficas.

Com base na detecção do gene *18S* rRNA, métodos moleculares direcionado à detecção do DNA genômico de piroplasmas são amplamente utilizados na confirmação da infecção devido a sua alta sensibilidade e especificidade (SUDAN et al., 2017). Além deste, o gene da proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) também pode auxiliar na classificação de espécies (YAMASAKI et al., 2002).

A região ITS é uma região espaçadora presente no DNA ribossômico eucariótico existente entre os genes que codificam *18S*, *5.8S* e *28S* rRNAs. Para caracterização molecular de espécies, esta região também vem sendo utilizada no diagnóstico de piroplasmídeos (HE et al., 2017; SHOCK et al., 2014).

Para o diagnóstico de hemoplasmas, a amplificação principalmente de fragmentos dos genes *16S* rRNA, *28S* rRNA e RNase P gene (*rnpB*) são mais utilizadas (TASKER et al., 2010; MONGRUEL et al., 2020). Reações de PCR em tempo real apresentam maior sensibilidade e permitem a quantificação do agente na amostra analisada, o que favorece o monitoramento dos estágios da infecção (BRADDOCK et al., 2004).

A PCR em Tempo Real (qPCR) é uma outra variante da técnica de PCR que permite o acompanhamento da síntese dos fragmentos alvo ao longo da própria reação e não ao final como na técnica convencional (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007). Durante a reação, é possível observar uma fluorescência que indica a produção dos fragmentos amplificados a cada ciclo, o que permite maior sensibilidade e velocidade na obtenção de resultados, além da quantificação do agente na amostra analisada (SOLA, 2011).

A técnica é menos propensa a contaminações quando comparada aos métodos convencionais, e caso haja, pode ser observada facilmente por meio da análise das curvas de “melting” (PEREIRA, 2012). Diversas espécies já foram detectadas através desta técnica em

amostras de seres humanos (RELLER; DUMLER, 2018), carrapatos (CICCULLI et al., 2020), ovelhas, bovinos, cavalos, cabras e cães (DAHMANI et al., 2017), entre outros.

A PCR multiplex é uma variante de diagnóstico amplamente utilizada. A técnica consiste na detecção de dois ou mais agentes infecciosos numa mesma reação e amostra, ao utilizar diferentes primers iniciadores (VIEIRA et al., 2019). Este ensaio já foi descrito sendo utilizado na detecção de espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em roedores (BENEVENUTE et al., 2017), para a detecção de *Babesia rossi* e *Babesia vogeli* em cães (TROSKIE et al., 2019) e espécies de *Mycoplasma* em gatos (LEE et al., 2018).

2.4 Avaliação da medula óssea em animais silvestres

A medula óssea é considerada um tecido semissólido, com função hematopoiética e local de produção primária de linfócitos. Está localizada no interior de ossos longo e chatos, sendo um microambiente organizado, que fornece suporte estrutural e nutricional para a diferenciação, proliferação, maturação e liberação ordenada de elementos celulares sanguíneos (SHARKEY; HILL, 2010; HARVEY, 2012). Sua principal função está relacionada à produção das linhagens eritrocítica, mielocítica e megacariocítica em resposta a demandas periféricas, sendo um local extremamente sensível ao requerimento (SHARKEY; HILL, 2010).

A avaliação da medula óssea recebe o nome de mielograma, e esta vem sendo amplamente utilizada não apenas no diagnóstico de anormalidades do sistema hematopoiético como as citopenias (anemia, leucopenia e trombocitopenia) (HARVEY, 2001). O uso para o estadiamento das neoplasias, como leucemias e linfomas, realização de citometria de fluxo, imuno-histoquímica, citogenética convencional e a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. também podem ser feitas a partir do material medular (BAIN, 2001; SANTIAGO, 2007; DE ALENCAR, 2002).

São escassos estudos envolvendo a análise deste tipo de tecido em animais selvagens, por se tratar de uma técnica que requer habilidade na obtenção da amostra, bem como preparação anestésica prévia do paciente. Os poucos estudos existentes que envolvem a coleta do aspirado medular em *Didelphis* sp. são direcionados à detecção de agentes infecciosos, principalmente *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (HUMBERG et al., 2012; ROELLIG, 2009). Não há relatos da investigação da infecção por agentes patogênicos da família Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae e Piroplasmataceae neste tipo de amostra, apesar de alguns estudos demonstrarem uma possível atuação destes como possíveis reservatórios (GUIMARÃES et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies amostradas e áreas de estudo

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de sangue e medula óssea de 15 gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) de vida livre, adultos, sendo 9 fêmeas e 6 machos, recebidos no período de agosto de 2020 a junho de 2021 no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS - Seropédica/Rio de Janeiro) e no Centro de Recuperação de Animais Silvestre (CRAS - Vargem Pequena/Rio de Janeiro). O referido projeto possui autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob o número 76330-1 (Anexo 1). As atividades do presente projeto também foram realizadas em parceria com a Universidade Estácio de Sá, sendo amparado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, sob o número 009/2021 (Anexo 2).

3.2 Contenção, avaliação clínica e coleta de sangue

Com o auxílio de luvas de couro os animais foram contidos inicialmente, sendo segurados pela cauda e acondicionados em caixas de transporte para posterior pesagem. Feito isto, os animais foram retirados da caixa e imobilizados.

Uma avaliação clínica foi realizada, com aferição de temperatura corpórea, avaliação da coloração de mucosas, pesquisa e coleta de ectoparasitas e determinação do escore corporal. Em seguida procedeu-se a coleta de sangue, através de venopunção da veia da cauda, utilizando-se agulhas hipodérmicas (0,55x20mm) e seringas estéreis de 3ml, coletando-se um volume aproximado de 2ml.

Após a obtenção das amostras de sangue, estas foram acondicionadas em tubos de 4mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do hemograma. Ao final, as amostras de sangue foram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular.

3.3 Análise Hematológica

A análise hematológica foi realizada através do contador hematológico automático de células (Poch 100iV/Roche), inserindo-se a amostra contendo EDTA. Os parâmetros hematológicos determinados foram contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), determinação de hemoglobina (g/dL), volume globular (%), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (%) e volume globular médio (VGM) (fl). Foram preenchidos por sangue edetado capilares de microhematócrito, e depositado sobre uma lâmina de vidro uma gota da amostra para a confecção de esfregaço sanguíneo. Posteriormente, as lâminas foram coradas em kit de coloração hematológico rápida, Panótico Rápido[®], e em seguida observadas com auxílio de microscópio óptico em objetiva de imersão – aumento de 1000x (Nikon E200mv led[®]). A morfologia das células sanguíneas e leucometria específica (percentual e posteriormente absoluta de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) foram avaliadas e obtidas a partir do esfregaço sanguíneo com auxílio de microscópio óptico, objetiva de imersão com aumento de 1000x (JAIN, 1993). A concentração de proteínas totais foi determinada pela técnica de refratometria.

As fotografias de amostras positivas foram obtidas com o auxílio do microscópio de luz polarizada Olympus modelo BX51, acoplado a uma câmera da mesma marca modelo UC30 localizado no Laboratório de Microscopia e Processamento de Bioimagens (LAMBIO) do Departamento de Parasitologia Animal (IV/UFRRJ).

3.4 Coleta das amostras de medula óssea

Devido ao tamanho corpóreo de alguns gambás deste estudo, a coleta de medula óssea só foi realizada em dez animais, na tentativa de se obter uma quantidade significativa de amostra para posterior análise. Para isto, os gambás foram sedados inicialmente com Cloridrato de Cetamina (15mg/kg) e Midazolam (0,3mg/kg) via intramuscular. Em posterior, foi realizado o acesso venoso através da veia da cauda ou veia cefálica para manutenção anestésica com Propofol (1mg/kg).

A obtenção do aspirado de medula óssea foi realizada após a sedação mencionada anteriormente em associação com um bloqueio local do periósteo, utilizando-se Cloridrato de Lidocaína (1mg/Kg). Foram colhidos aproximadamente 200 μl de medula óssea da extremidade proximal do úmero ou fêmur com o auxílio de agulhas de mielograma Lang Medical[™] acopladas a seringas de 20mL contendo o anticoagulante EDTA. Ao final, as amostras foram

acondicionadas em micro tubos estilizados e armazenadas à -20°C para posterior análise molecular.

3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.5.1 Extração de DNA e verificação de gene endógeno

As extrações de DNA do sangue periférico e da medula óssea foram realizadas com o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 200µL de cada amostra. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas até a realização dos ensaios moleculares. (colocar no artigo)

A detecção de DNA amplificável foi verificada por meio de uma reação de PCR convencional visando os genes endógenos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) e o gene IRBP (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”), ambos de mamíferos. A partir disto, as amostras positivas foram submetidas aos ensaios de PCR específicos para os agentes patogênicos deste estudo.

3.5.2 Reação de amplificação

As análises moleculares foram realizadas em parceria com o Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP – campus Jaboticabal), sob o apoio e supervisão do Professor e Dr. Marcos R. André. Nas reações de PCR foram utilizados 5µL de DNA da amostra. Os oligonucleotídeos iniciadores e as sequências térmicas utilizadas nas reações estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações de PCR, utilizadas para detecção molecular de Agentes patogênicos pertencentes à família Anaplasmataceae baseada no gene 16S rRNA, *Mycoplasma* spp. baseadas no gene 16S rRNA e Ordem Piroplasmida baseada no gene 18S rRNA.

Agente / gene	Sequência do oligonucleotídeo	Referência
Anaplasmataceae - EHR16SD - EHR16SR	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	INOKUMA et al., 2000
Sequência térmica:	95°C por 5 min; 34 ciclos repetidos (95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1:30s) 72°C por 5 min	
<i>Mycoplasma</i> spp. - Myco16S-322s - Myco16S-938as	5'-GCCCATATTCTACGGGAAGCAGCAGT-3' 5'-CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC-3'	MAGGI et al., 2013
Sequência térmica:	95°C por 2 min 55 ciclos repetidos (94°C por 15 s, 68°C por 15 s e 72°C por 18 s) 72°C por 1 min	
Ordem Piroplasmida 1ª Reação - BTF1 - BTR1	5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3' 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'	JEFFERIES et al., 2007

2ª Reação
- BTF2
- BTR2

5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'
5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Sequência térmica: 94° por 3 min
58° por 1 min
72° por 2 min
45 ciclos repetidos (94°C por 30 s, *58°C por 20 s e 72°C por 30 s)
72°C por 7 min

*Na segunda reação utilizou-se 1µL do produto da primeira reação e repetiu-se o mesmo ciclo, modificando-se apenas a temperatura de anelamento para 62°C.

3.5.3 PCR para bactérias da Família Anaplasmataceae

Para as reações de amplificação de agentes patogênicos pertencentes à família Anaplasmataceae foram utilizados 1,25U/µL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®) que contém 20mM de Cloreto de Magnésio, Tampão da PCR (PCR buffer 10X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (EHR16SD e EHR16SR) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Amostras de DNA de *A. phagocytophilum*, gentilmente cedidas pelo Professor John Stephen Dumler (Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, MD, USA) e *E.canis*, obtidas de células DH82 infectadas com a cepa Jaboticabal de *E.canis* (AGUIAR et al., 2007) foram utilizados como controles positivos e água ultrapura estéril (Nuclease-Free Water, Promega Corporation) como controle negativo.

3.5.4 PCR *Mycoplasma* spp.

Para as reações de amplificação de hemoplasmas foram utilizados 1,25 U/µL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®) que contém 20mM de Cloreto de Magnésio, Tampão da PCR (PCR buffer 10X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), 0,4mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,3µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Myco16S-322s e Myco16S-938as) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Foi utilizado um controle positivo de *Mycoplasma suis* (GATTO et al., 2019) isolado e caracterizados no Laboratório de Imunoparasitologia – UNESP/Jaboticabal e água ultrapura estéril (Nuclease-Free Water, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) como controle negativo.

3.5.5 PCR Ordem Piroplasmida

Para a primeira reação de amplificação de Piroplasmata foram utilizados 0,75 U/µL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®) que contém 20mM de Cloreto de Magnésio, Tampão da PCR (PCR buffer 10X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), 0,4mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (BTF1 e BTR1) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Nas reações de nested-PCR, foram utilizados 1µL do produto amplificado da primeira reação de PCR, em um mix contendo os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação. Foi utilizado um controle positivos de *Babesia vogelli* (FURUTA et al., 2009) obtido de um cão experimentalmente infectado, sendo posteriormente isolado e caracterizados no Laboratório de Imunoparasitologia – UNESP/Jaboticabal e água ultrapura estéril (Nuclease-Free Water, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) como controle negativo.

3.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base. Os resultados foram visualizados e analisados através de um trans iluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-EyeII Stratagene®).

3.6 Sequenciamento de Nucleotídeos

Apenas os produtos da amplificação das reações de PCR convencional que foram utilizadas no diagnóstico de Piroplasmas, baseadas na detecção do gene 18S rRNA foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus de Jaboticabal).

3.7 Análise Filogenética

As sequências consenso foram obtidas através da análise das sequências sense e antisense usando o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTn) o programa BLAST foi utilizado, objetivando-se procurar e comparar as sequências obtidas com outras similares já depositadas no banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002).

Um banco de dados foi montado a partir de sequências de 18S rRNA de Piroplasmas. A sequência foi alinhada com as disponíveis no GenBank usando Clustal / W (THOMPSON et al., 1994) e ajustada no Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). A reconstrução filogenética foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança. Os modelos de substituição de nucleotídeos foram selecionados com base no critério de informação de Akaike (AIC) no software Mega X (KUMAR et al., 2018).

O modelo de Kimura-2-parâmetros foi usado para calcular as distâncias evolutivas. A combinação de clusters filogenéticos foi avaliada usando um teste de bootstrap com 1000 réplicas para testar diferentes reconstruções filogenéticas. A avaliação filogenética foi realizada por meio do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

3.8 Análise Estatística

Os dados hematológicos foram submetidos a análise estatística descritiva, por meio de distribuições absolutas e percentuais pelas medidas média, mediana, valor mínimo e máximo utilizando-se o programa de análise estatística Bioestat 4.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Tefé/AM).

4 CAPÍTULO

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de artigo científico, a seguir:

4.1 CAPÍTULO 1 – “Investigation of infection by Anaplasmataceae Agents, Piroplasmids and Hemoplasmas in peripheral blood and bone marrow samples from black-eared-opossums (*Didelphis aurita*) in the metropolitan region of Rio de Janeiro”

¹OLIVEIRA, Ágatha Ferreira Xavier; ²CALCHI, Ana Cláudia; ¹STOCCO, Naiara Vidal; ¹STOCCO, Anieli Vidal; ³PIRES, Jeferson Rocha; ⁴GUIMARÃES, Andresa; ¹BALTHAZAR, Daniel de Almeida; ²MACHADO, R.Z.; ²ANDRÉ, Marcos Rogério; ^{1*}BALDANI, Cristiane Divan

¹Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

²Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

³Centro de Recuperação de Animais Silvestres – CRAS, Universidade Estácio de Sá – UNESA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Instituto Nacional da Mata Atlântica – INMA, Santa Tereza, ES, Brasil

*Corresponding author: Cristiane Divan Baldani. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rod. BR 465, Km 47, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. e-mail: crisbaldani@gmail.com

1 SUMMARY

The objective of this study was to investigate the presence of pathogens from the families Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae and piroplasmids in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) and to evaluate clinical signs and hematological abnormalities associated with infection. From September 2020 to July 2021 a total of 15 black-eared opossums were received at the Centro de Triagem de Animais Silvestres – CETAS-RJ and at the Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – CRAS-RJ. Peripheral blood samples from all animals and bone marrow from ten of fifteen were collected. To avoid false-negative results, all samples were subjected to prior molecular analysis to detect the endogenous genes *gapdh* and *IRBP*. DNA detections from Anaplasmataceae and Mycoplasma spp. were based on the 16S rRNA gene and Piroplasmids on the 18S rRNA gene. All whole blood and bone marrow samples tested were negative for Anaplasmataceae Agents. Twenty percent (3/15) of the animals were positive for Mycoplasma spp. only in whole blood samples and of these 66.6% (2/3) had comorbidities such as excoriations and fractures related to urban accidents. For the order Piroplasmida, 33.3% (5/15) of the animals were positive in whole blood and bone marrow samples and 80% (4/5) had comorbidities. The phylogenetic inference was performed using the 18S rRNA gene positioned the piroplasmid species detected in *D. aurita* near to *Theileria bicornis* detected in white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) from South Africa. One animal positive for Piroplasmids presented flea infestation, icteric mucosa, and decreased mean corpuscular hemoglobin value and another animal presented anemia (hematocrit of 23.5%) and decreased plasma protein value (5g/dl). Thirteen-point thirty-three percent (2/15) of the opossums were co-infected with Piroplasmida and Hemoplasmas. This study indicates the existence of important hemoparasite infections in *D. aurita* from the metropolitan region of Rio de Janeiro, which reinforces the need for new epidemiological studies to clarify the participation of these animals in the occurrence of these diseases in domestic animals and humans.

Keywords: hemoparasitosis, marsupial, bone marrow, molecular diagnosis.

2 INTRODUCTION

Among the main wild reservoirs of infectious agents, also considered synanthropic animals, are the marsupials *Didelphis* sp., popularly known as opossums (BEZERRA-SANTOS et al., 2021). The interaction of these animals with humans is old, a fact linked to their great adaptive capacity even in very devastated areas (CRUZ-SALAZAR, RUIZ-MONTOYA, 2020). However, the proximity to urban centers exposes these animals to life risks in addition to favoring the circulation of pathogens previously restricted to wild environments (BARROS; DE AGUIAR AZEVEDO, 2014). Opossums are suggested as possible reservoirs of a variety of parasites (BEZERRA-SANTOS et al., 2021). The members of the Anaplasmataceae family are intracellular obligate, Gram-negative, and pleomorphic bacteria (DUMLER et al., 2001). Few studies report infections by these agents in *Didelphis* sp. (GUIMARÃES et al., 2018; DE SOUSA et al., 2017). Piroplasmids are apicomplexan hemoprotozoans and species of this order have been reported in opossums with no clinical and hematological signs (YABSLEY AND SHOCK, 2014; SOARES et al., 2017; GONÇALVES et al., 2021). Hemotrophic mycoplasmas are Gram-negative, pleomorphic, and small bacteria (0.3 to 0.8 μ M) (ALMOSNY; SOUZA, 2012), and a potentially new species were identified in opossums from southern Brazil, named '*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*' (GONÇALVES et al., 2020; PONTAROLO et al., 2021). The existence of co-infections is extremely common in wild animals (BORDES AND MORAND, 2011) despite this, there are few reports in Brazilian opossums involving the agents mentioned above. This scenario motivated the present study, which carried out a preliminary investigation of these infections in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) received at wild animal screening centers located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro.

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Animals

In the period of August 2020 and July 2021, 15 black-eared-opossums (*Didelphis aurita*) selected by non-probability convenience, were received by Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ) and Centro de Recuperação de Animais Silvestres da Universidade Estácio de Sá (CRAS-RJ), state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. This study was previously approved by the Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO n. 76330-1) and Ethics Committee on the Use of Animals of the Universidade Estácio de Sá (n. 009/2021).

3.2 Blood and bone marrow samples

Blood samples were collected through venipuncture of the tail ventral vein, using hypodermic needles and sterile syringes of 3ml, collecting an approximate volume of 2ml. The samples were placed in tubes containing the anticoagulant (Ethylenediaminetetraacetic acid). The bone marrow aspirate was obtained after the general anesthesia in association with a local blockage of the periosteum. Approximately 200 μ l of bone marrow were collected from the proximal end of the humerus or femur with the aid of Lang Medical™ myelogram needles attached to 20mL syringes containing EDTA anticoagulant. After processing, blood and bone marrow samples were stored at -20°C for further molecular analysis.

3.3 Hematological analysis

The hematological analysis will be performed using the automatic hematological cell counter (Poch 100iV/Roche), inserting the sample containing EDTA. The hematological parameters determined will be red blood cell count ($\times 10^6/\mu\text{L}$), leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$) and platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$), hemoglobin determination (g/dL), globular volume (%), mean globular hemoglobin concentration (%) and mean globular volume (fl). Blood and microhematocrit capillaries will be filled with blood, and a drop of the sample will be deposited on a glass slide to make a blood smear. Subsequently, the slides will be stained in a rapid hematological staining kit (Panótico Rápido[®]), and then observed with the aid of an optical microscope in an immersion objective – 100x magnification (Nikon E200mv led[®]). The morphology of blood cells and specific leukometry (percentage and later absolute of eosinophils, neutrophils, lymphocytes, monocytes, and basophils) was evaluated and obtained from the blood smear with the aid of an optical microscope, 100x immersion objective. The concentration of total proteins will be determined by the refractometry technique.

3.4 DNA extraction

Peripheral blood and bone marrow DNA extractions were performed with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen[®]) according to the manufacturer's recommendations, using 200 μL of each sample. The detection of amplifiable DNA was verified through a conventional PCR reaction targeting the endogenous genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) and the IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein) gene, both from mammals. After, positive samples were submitted to specific PCR assays for the agents in this study. All total DNA samples had their concentrations determined by the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific[®]), separated into aliquots and stored until the molecular assays were carried out.

3.5 Molecular analysis

Each sample of extracted DNA was used as a template in 25 μL reaction mixtures. Positive controls were previously isolated in the Immunoparasitology Laboratory – UNESP/Jaboticabal.

3.5.1 Anaplasmatataceae (16S rRNA)

For the amplification reactions of Anaplasmatataceae, 0,75 U/ μL Xtra Platus Taq DNA Polymerase (Sinapse[®]) was used, which contains 20mM Magnesium Chloride, PCR Buffer (PCR buffer 1X – 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl), 0,4 mM of deoxynucleotides (dATP, dTTP, dCTP and dGTP), 0,5 μM of genus and species-specific primers for Anaplasmatataceae (INOKUMA et al., 2000) (Table 1) and sterile ultra-pure water (Life Technologies[®]) psp 25 μL .

3.5.2 Piroplasmida (18S rRNA)

For the first Piroplasmida amplification reaction, 1,25 U/ μL Xtra Platus Taq DNA Polymerase (Sinapse[®]) will be used, which contains 20mM Magnesium Chloride, PCR Buffer (1X PCR buffer – 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl), 0,4mM of deoxynucleotides (dATP, dTTP, dCTP and dGTP), 0,5 μM of genus and species-specific primers for Piroplasmida (JEFFERIES et al., 2007) (Table 1) and sterile ultra-pure water (Life Technologies[®]) psp 25 μL . In nested-PCR reactions, 1 μL of the amplified product from the first PCR reaction was used, in a mix containing the reagents at the same concentrations of the first reaction.

3.5.3 *Mycoplasma* spp. (16S rRNA)

For hemoplasma amplification reactions, 0,75 U/ μ L Xtra Plus Taq DNA Polymerase (Sinapse[®]) was used, which contains 20mM Magnesium Chloride, PCR Buffer (1X PCR buffer – 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl), 0,4mM of deoxynucleotides (dATP, dTTP, dCTP and dGTP), 0,3 μ M of genus and species-specific primers for *Mycoplasma* spp. (MAGGI et al., 2013) (Table 1) and sterilized ultra-pure water (Life Technologies[®]) psp 25 μ L.

Table 1. Description of primers, PCR product size, and references used in PCR assays for Agents Anaplasmataceae based on the 16S rRNA gene, agents of the Order Piroplasmid based on the 18S rRNA gene, and *Mycoplasma* spp. based on the 16S rRNA gene.

Agent and Primers	Oligonucleotide Sequence	Product PCR Size	References
Anaplasmataceae EHR16SD EHR16SR	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	345 bp	INOKUMA et al., 2000
Piroplasmida BTF1 BTR1	5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3' 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'	800 pb	JEFFERIES et al., 2007
Nested BTF2 BTR2	5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3' 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'		
<i>Mycoplasma</i> spp. Myco16S-322s Myco16S-938as	5'-GCCCATATTCTACGGGAAGCAGCAGT-3' 5'-CTCCACCACTTGTTCAAGTCCCCGTC-3'	616 bp	MAGGI et al., 2013

3.6 Purification and sequencing

Only the amplification products of the conventional PCR reactions that were used in the diagnosis of Piroplasms, based on the detection of the 18S rRNA gene, were purified with Wizard[®] SV Gel kit and PCR Clean-Up System (Promega), according to the manufacturer's recommendations. The sequencing was carried out using the dideoxynucleotide chain termination method (SANGER et al., 1977), conducted in the ABI PRISM 3700 DNA Analyzer sequencer (Applied Biosystems[®]) at the Center for Biological Resources and Genomic Biology (CREBIO - Faculty of Agricultural Sciences and Veterinary – UNESP/ Campus de Jaboticabal).

3.7 Phylogenetic analyses

Consensus sequences were obtained through the analysis of the sense and antisense sequences using the Bioedit v. 7.0.5.3 program (HALL, 1999). We compared our sequences with those deposited in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) (BENSON et al., 2002). The sequences were aligned with sequences published in GenBank using Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) and manually adjusted in Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Phylogenetic reconstruction was inferred by the Maximum Likelihood method. Nucleotide substitution models were selected based on the Akaike non-information criterion (AIC) in the

Mega X software (KUMAR et al., 2018). The 2-parameter Kimura model was used to calculate evolutionary distances. A combination of phylogenetic clusters was evaluated using a 1000-replica bootstrap test to test different phylogenetic reconstructions. The phylogenetic evaluation was performed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0 (TAMURA et al., 2013). The 2-parameter Kimura model was used to calculate evolutionary distances. A combination of phylogenetic clusters was evaluated using a 1000-replica bootstrap test to test different phylogenetic reconstructions. The phylogenetic evaluation was performed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4 RESULTS

4.1 PCR endogenous control

To exclude false-negative results due to the presence of PCR inhibitors, the DNA samples were subjected to a conventional PCR reaction to amplify the endogenous mammalian gene *gapdh* (BIRKENHEUER et al., 2003). In this reaction, ten whole blood samples and all bone marrow samples were positive. Five samples were negative and a second reaction based on the *IRBP* gene (retinoid-binding interphotoreceptor protein) was performed (FERREIRA et al., 2010) obtaining positive results.

4.2 Anaplasmatataceae (16S rRNA)

All whole blood and bone marrow samples tested were negative for Anaplasmatataceae Agents.

4.3 *Mycoplasma* spp. (16S rRNA)

In whole blood samples, 20% (3/15) of the animals were positive for *Mycoplasma* spp, being two females and one male, all adults (Table 3). Of these, 66.6% (2/3) had fractures and other injuries observed on physical examination in association with hemogram findings of leukocytosis and neutrophilia (Table 2). None of the bone marrow samples was positive.

4.4 Pyoplasמידs (18S rRNA)

For Piroplasmids, 33.3% (5/15) of the animals were positive in whole blood samples, three females and two males, all adults (Table 3). Of these, 60% (3/5) also demonstrated positivity for the agent in bone marrow samples. 80% (4/5) of the positive animals had injuries, but only two animals had neutrophilic leukocytosis (Table 2). Just one of the positive animals for both blood and bone marrow had icteric mucosa and a decrease in the mean value of corpuscular hemoglobin. For this sample, it was possible to observe intraerythrocytic forms of the parasite in blood smears (Figure 1). The hematocrit for this animal was within the reference value for the species, however, there were signs of regeneration, such as moderate erythrocyte anisocytosis and polychromasia. Only one animal showed anemia (23.5% of Ht) with decreased plasma protein value (5 g/dl) (Table 2).

4.5 Coinfection

Some opossums (13.33% - 2/15) were co-infected in whole blood samples by *Mycoplasma* spp. and Piroplasmids. They were two adult females, and only one had

comorbidity (Table 3). However, concerning hematological findings, only the healthy animal presented neutrophilic leukocytosis, possibly due to systemic stress.

4.6 Phylogenic Analysis

The positive samples for Piroplasmids targeting 18S rRNA gene sequencing presented good quality sequences with the formation of consensus sequences. The analysis by BLASTn demonstrated that the sequences from the opossum showed 95.20% identity with a sequence from *Theileria bicornis* detected in rhinoceros in South Africa (OTIENDE et al., 2015) (Figure 2). However, the position in the Piroplasmids phylogenetic tree of the present study places the species in a clade of *Theileria bicornis*, supported by a low Bootstrap value.

5 DISCUSSION

In this study, all blood samples were negative in detecting the 16S rRNA gene for Anaplasmataceae in conventional PCR. Similar data were reported by Bezerra-Santos et al. (2020), when evaluating blood, spleen, and tick samples obtained from *Didelphis aurita* from urban regions of Southeastern Brazil and by Colle et al. (2019) in blood and tissue sampled from marsupials from the Brazilian Amazon biome.

Guimarães et al. (2018) when evaluating blood samples of *Didelphis* sp. from areas similar to those in the present study, found positivity for a possible new genotype of *Ehrlichia* spp. by 2.7% when using a nested-PCR. Evaluating samples of 102 opossums (*D. marsupialis* and *D. virginiana*) from Mexico, *Anaplasma phagocytophilum* showed a prevalence of 3% also using nested-PCR based on 16S rRNA gene (ROJERO-VÁZQUEZ et al., 2017).

In addition to molecular studies, serological studies also suggest the circulation of these agents in opossums. Antibodies against *E. canis* in *Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris* captured in the state of São Paulo southeastern Brazil showed 14.6% of seropositivity (MELO et al., 2016).

Bone marrow aspirates tested negative for the Anaplasmataceae family. In subclinical and chronic infections, dogs can demonstrate false-negative results in blood samples, and tissues such as bone marrow would be more sensitive for detection (RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al., 2020), which was not evidenced in this study.

Infection with *Mycoplasma* spp. in the samples of whole blood showed positivity in 20% of the animals in this study. Massini et al. (2019) found 87.5% positivity for *Mycoplasma* spp. in white-eared opossums in southern Brazil, and of these 37% were infested by ticks of the genus *Amblyomma* spp. Although the participation of ticks in the transmission of hemoplasmas is not well understood, it is already known that they transmit other important hemoparasites in animals and humans (GILBERT, 2021). In *Didelphis albiventris* from Midwestern Brazil, the infection was 32.5% and ticks of the species *Amblyoma dubitatum* were also collected from the sampled animals (GONÇALVES et al., 2020). During the inspection of the opossums in this study, the presence of ticks was not detected, a fact that could justify the lower occurrence of the infection. A new species of hemoplasma was recently detected in white-eared opossums in southern Brazil, named '*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*', a species closely related to '*Candidatus Mycoplasma haemodidelphis*' (MASSINI et al., 2019; PONTAROLO et al., 2021). Of these, 12% had *Ctenocephalides felis felis* flea infestation, but despite this, the DNA of hemoplasmas already detected in white-eared opossums has not been found in fleas to date.

In the present study, 66.6% of the black-eared opossums that showed positivity for hemoplasmas had inflammatory conditions related to their exposure to urban environments. The white blood cell count of these animals revealed neutrophilic leukocytosis, a finding closely

related to inflammatory conditions or systemic stress mediated by cortisol (THRALL et al., 2012). Reports correlating concomitant diseases or situations of immunosuppression with the occurrence of infections by hemotropic mycoplasmas are described mainly in dogs in infections by *M. haematoparvum* and *M. haemocanis* and cats in infections by '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (TASKER et al., 2020). To date, there are no reports in the literature that correlate the occurrence of infections by *Mycoplasma* spp. with the presence of concomitant diseases in *Didelphis* sp.

All bone marrow samples were negative for *Mycoplasma* spp., even in animals positive in peripheral blood, a fact that may be linked to the greater availability of red blood cells in the systemic circulation. Furthermore, in circulation, bacteria can readily detach themselves from the erythrocyte surface, in an attempt to escape from the host's phagocytic system, which allows them to remain in the organism for a longer period (MESSICK, 2004). New insights into the dynamics of infections in different cellular tissues are needed for *Mycoplasma* spp. found in opossums.

Although several studies have correlated hemoplasma infections with anemia, in this one, the positive animals showed erythrogram values within the reference for the species (CASAGRANDE et al., 2009). This fact may be related to the mechanisms of adhesion and pathogenesis of species circulating in *Didelphis* sp. in addition to the immunological aspects of these hosts, requiring further studies for further clarification.

33.3% of *D. aurita* sampled in this study were positive for piroplasmids. Likewise, studies carried out in *D. albiventris* from Campo Grande and Brasília demonstrated positivity for piroplasmids in analyzes directed to the region of the 18S rRNA gene in 25.5% and 48.5%, respectively (GONÇALVES et al., 2021).

Three animals in the present study demonstrated positivity for Piroplasmids in peripheral blood samples and also in the bone marrow. Although previous studies demonstrated the circulation of these parasites in Brazilian marsupials (SOARES et al., 2017; GONÇALVES et al., 2021) there are no reports of molecular detection in bone marrow samples to date.

In infections with *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in dogs and horses, it is suggested that there is a vascular spread of the agent in virtually all host organs during the acute phase of the disease, and immunosuppressed animals may exhibit consistent clinical and hematological signs (BIRKENHEUER et al., 2004; PITEL et al., 2010). In this sense, Da Serra Freire et al. (1979) demonstrated that the parasitemia by *Babesia brasiliensis* in opossums submitted to immunosuppressive corticotherapy increased considerably, leading one of the animals to death, and the presence of the parasite in several organs was observed at necropsy.

Icteric mucosa and decreased hemoglobin value were observed in one animal and anemia with decreased total plasma protein in another individual, both positive in blood and bone marrow for piroplasmids. Manifestations such as these may indicate an existing hemolytic picture, which in *Babesia* spp. they can occur by intravascular or extravascular mechanisms (BILIĆ et al., 2018). The erythrocyte destruction and associated clinical manifestations are not always proportional to the degree of anemia and the level of parasitemia, having direct interference of the host's immune system (EICHENBERGER et al., 2017; BILIĆ et al., 2018).

Most of the animals positive for piroplasmids in the present study had comorbidities related to urban accidents, corroborating Da Serra Freire et al. (1979), who observe an influence of the clinical state on the detection of infection. At the same time, studies of theileriosis in cattle indicate a systemic immune dysregulation promoted by the cellular parasitism of schizonts, which alter the phenotype and function of defense cells, influencing the resolution of other concomitant diseases (BASTOS et al., 2019; CLIFT et al., al., 2021). With this, it is suggested that animals with comorbidities like the ones in the present study may present an increase in parasitemia, being more easily detected, and this would impair their recovery and a subsequent reintroduction to their natural environments.

More recent studies in Brazilian marsupials aimed at detecting a small fragment of the 18S rRNA gene for piroplasms (WOLF et al., 2016; SOARES et al., 2017; COLLE et al., 2019), being a fundamental analysis for screening positive animals, as well as the one performed in the present study. However, for a more reliable molecular characterization, other genes are being investigated (unpublished data), to allow greater precision regarding the phylogenetic positioning of the species that infect *Didelphis aurita* from Rio de Janeiro, as previously recommended by Gonçalves et al. (2021).

The two animals co-infected with hemoplasma and piroplasmids in this study were adult females, and a large part of the females rescued at the screening centers are postpartum (TARDIEU et al., 2020). During this period, in addition to being easy targets for attacks and other accidents, they are more susceptible to infections because they are immunologically debilitated, which would justify the finding.

Investigations of Piroplasmid infections in association with other agents in marsupials have already been reported, investigating *Hepatozoon* sp., *Anaplasmatidae*, and *Coxiella* sp. (WOLF et al., 2016; SOARES et al., 2017; COLLE et al., 2019). However, studies of coinfections involving hemoplasmas have not been reported in opossums to date.

Reports in wild rodents and domestic felines indicate that transmission of hemotropic mycoplasmas occurs through aggressive interactions (MUSEUX et al., 2009; COHEN et al., 2018). Females of *Didelphis* sp. have an instinctive aggressiveness temperament intensified in the postpartum period (TARDIEU et al., 2020), a fact that could favor the occurrence of these infections.

It is noteworthy that several wild species tolerate multiple parasitic loads and act as amplifiers of pathogens in the environment (BORDES et al., 2011). However, the identification of immunological determinants and their correlation with the occurrence of these diseases still represent a challenge in studies in wild animals.

6 CONCLUSION

It is concluded in this study that *Didelphis aurita* coming from recovery centers for wild animals located in the metropolitan region of Rio de Janeiro can harbor Piroplasmids at the peripheral level and also in the bone marrow. Furthermore, this is the first report of the existence of co-infection by piroplasmids and hemoplasma in this species, which highlights the importance of these animals as a reservoir of emerging diseases.

7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ) and the Centro de Recuperação de Animais Silvestres da Universidade Estácio de Sá (CRAS-RJ) for allowing us to collect samples from the opossums housed in their facilities. We also thank the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) and the Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) for promoting our research. Thanks to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for financial support.

Figure 1. Intraerythrocytic forms of piroplasms evidenced in a blood smear of a black-eared opossum that presented jaundice and intense erythrocyte anisocytosis and polychromasia. A- ring-form trophozoites, B- tetrad (Maltese cross) forms (black arrows). Optical microscopy (100x magnification). Giemsa staining.

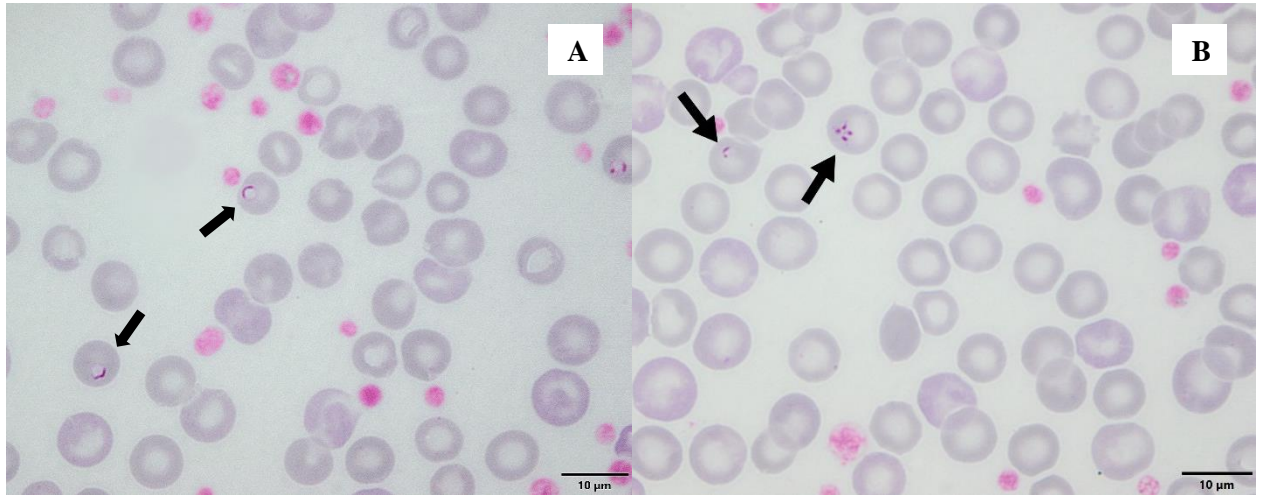


Table 2. Hematological results of black-eared opossum infected by *Mycoplasma* spp. and piroplasms compared with reference values according to Casagrande et al. (2009).

ID	2	7	8	14	20	22	Reference
PCR Result	C+	C+	P+	P+	P+	M+	Casagrande et al. (2009).
Ht (%)	26	30.8	27.4	50.5	23.5	28.6	[23.8 - 39.8]
RBC (10 ⁶ /μl)	3.62	3.7	3.55	7.14	3.28	4.06	[2.7 - 5.8]
Hb (g/dl)	7.2	9.2	6.9	14.7	6.9	9	[7.5 - 14.4]
MCV (fL)	71.8	83.2	77.2	70.7	71.6	70.4	[60 - 96.2]
MCHC (%)	27.7	29.9	25.2	29.1	29.4	31.5	[56.4 - 72.7]
WBC (10 ³ /μl)	11800	18700	10200	19100	5300	17700	[3255 - 13155]
Seg (10 ³ /μl)	6136	9724	5304	9932	2756	9204	[205 - 5727]
Mono (10 ³ /μl)	118	374	204	191	106	1593	[55 - 672]
Lymp (10 ³ /μl)	3304	5049	6222	9932	583	5664	[1222 - 6084]
Eos (10 ³ /μl)	1180	2805	1428	3056	636	1239	[248 - 2476]
Plat (/μl)	301.000	1.000.000	700.000	267.000	238.000	400.000	[443 - 586]
TPP (g/dl)	7	6.8	7.8	8	5	7.6	[7.4 - 9.5]

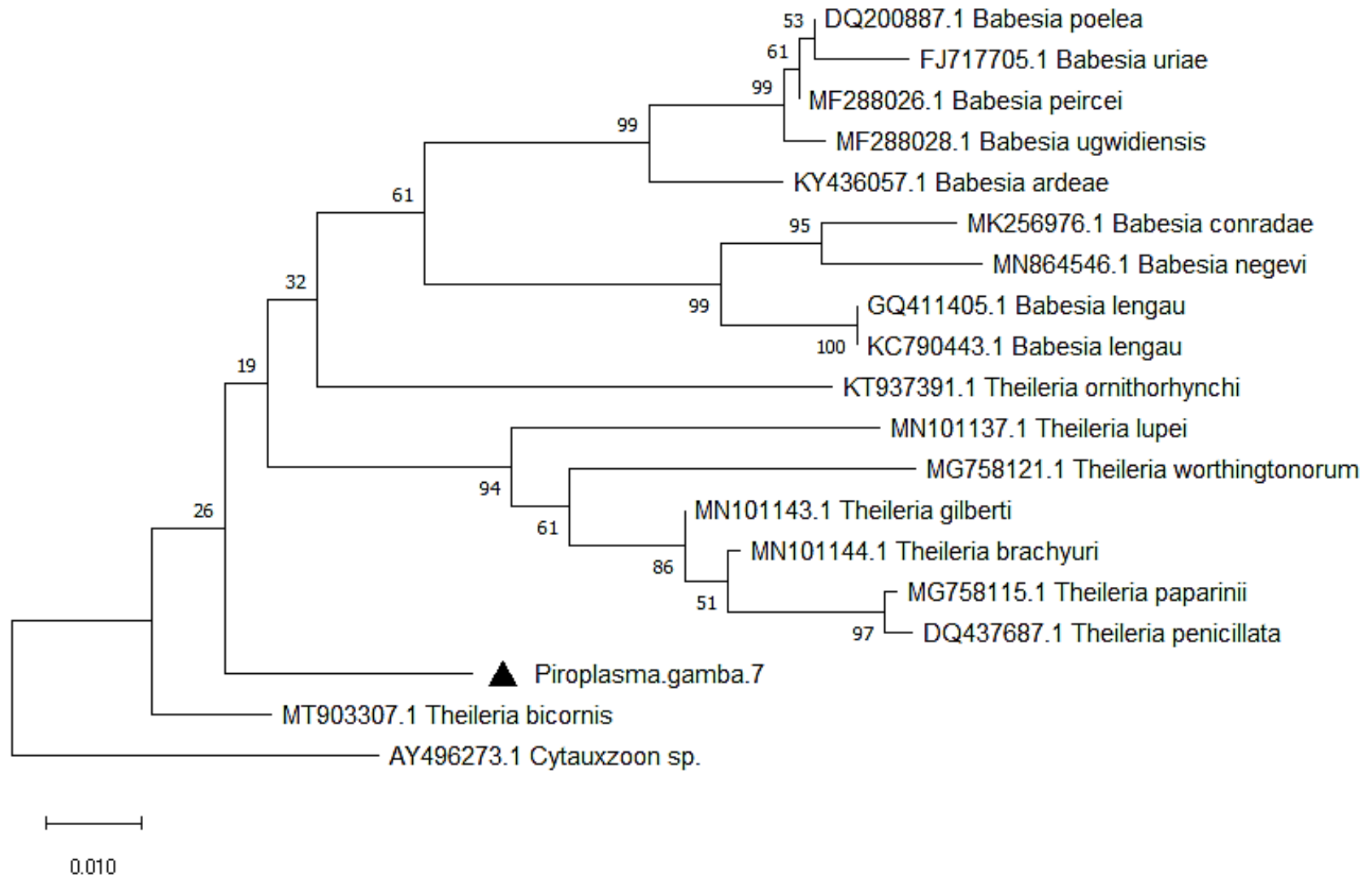
Ht: Hematocrit; RBC: Red blood cell count; Hb: Hemoglobin; MCV: Mean corpuscular volume; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC: White blood cell count; Seg: Segmented neutrophil; Mono: Monocyte; Lymp: Lymphocyte; Eos: Eosinophil; Plat: Platelets; TPP: Total plasma protein; C+: Co-infected; P+: Infected by Piroplasm; M+: Infected by *Mycoplasma* spp.

Table 3. Epidemiological information, clinical aspects, and results of molecular analyzes for Agents Anaplasmataceae, *Mycoplasma* spp., and Piroplasms in black-eared opossum's whole blood and bone marrow samples from the metropolitan region of Rio de Janeiro.

ID	Genre	Comorbidities	Samples	Anaplasmataceae PCR	<i>Mycoplasma</i> spp. PCR	Piroplasms PCR	Co-infection
2	F	Limb injury	WB	-	+	+	+
			BM	-	-	+	-
7	F	-	WB	-	+	+	+
			BM	-	-	+	-
8	F	Burn and fracture	WB	-	-	+	-
			BM	-	-	+	-
14	M	Blindness and apathy	WB	-	-	+	-
20	M	Tail injury and cachexia	WB	-	-	+	-
22	M	Limb injury	WB	-	+	-	-

F: Female; M: Male; WB: Whole Blood; BM: Bone Marrow.

Figure 2. Phylogenetic position of piroplasms isolated from a Brazilian opossum based on 18S rRNA sequences (800 bp). The tree was constructed using the neighbor-joining method, and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points.



5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I.; JUNIOR, D.; FONSECA, A.; SOARES, C.; ISHIKAWA, M. (2000). *Borrelia* sp. in naturally infected *Didelphis aurita* (Wied, 1826) (Marsupialia: Didelphidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 307-312, 2000.
- ABU BAKR, M. F. **Host-parasite interactions of two sympatric small mammals from South Africa**. Doctoral dissertation - University of Pretoria, África do Sul, 2016, 143p.
- AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural*, v. 37, p. 796–802, 2007.
- AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZANG, X.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L. H.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C. B.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SORES, H. S. SOARES; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S. M.; LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks Tick-Borne Diseases**, v. 5, p. 537-544, 2014.
- ALLSOPP, B. A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 123–135, 2010.
- ALMOSNY, N. R. P.; SOUZA, A. Hemobartonelose em pequenos animais domésticos e como zoonose.M.. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda; 2012. p. 90-101.
- ALVARADO-RYBAK, M.; SOLANO-GALLEGOS, L.; MILLÁN, J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 538, 2016.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p.
- ANDRÉ, M. R. Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p.7, 2018.
- ASTÚA, D. Range extension and first Brazilian record of the rare *Hyladelphys kalinowskii* (Herskovitz, 1992) (Didelphimorphia, Didelphidae)/Extension de distribution et première occurrence au Brésil du rare *Hyladelphys kalinowskii* (Herskovitz, 1992) (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 70, p. 174-176, 2006.
- BAIN, B. J. Bone marrow aspiration. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p.657-663, 2001.
- BARROS, F. B.; DE AGUIAR AZEVEDO, P. Common opossum (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758): food and medicine for people in the Amazon. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, p. 1-14, 2014.

BASTOS, R. G.; SEARS, K., DINKEL, K. D., KNOWLES, D. P., FRY, L. M. Changes in the molecular and functional phenotype of bovine monocytes during *Theileria parva* infection. **Infection and Immunity**, v. e00703, 2019.

BENEVENUTE, J. L.; DUMLER, J. S.; OGRZEWALSKA, M.; ROQUE, A. L. R.; MELLO, V. V. C.; DE SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using groEL gene for *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in rodents in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, p. 646–656, 2017.

BENSON, D. A.; MIZRACHI, I. K.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D.I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.17-20, 2002.

BEZERRA-SANTOS, M. A.; NOGUEIRA, B. C. F.; YAMATOOGI, R. S.; RAMOS, R. A. N.; GALHARDO, J. A.; CAMPOS, A. K. Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum *Didelphis aurita* in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 80, p. 329-338, 2020.

BEZERRA-SANTOS, M. A.; RAMOS, R. A. N.; CAMPOS, K.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. **Parasitology Research**, p. 1-21, 2021.

BILIĆ, P.; KULEŠ, J.; BARIĆ RAFAJ, R.; MRLJAK, V. Canine babesiosis: where do we stand. **Acta Veterinaria Belgrade**, v. 68, p. 127-160, 2018.

BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B. M.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A.; GONÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4172–4177, 2003.

BIRKENHEUER, A. J.; NEEL, J.; RUSLANDER, D.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 151–160, 2004.

BORDES, F.; MORAND, S. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 1, p. 7346, 2011.

BRADDOCK, J. A.; TASKER, S.; MALIK, R. The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 161-165, 2004.

BRASIL. Instrução normativa nº. 141, de 19 de dezembro de 2006. Regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. Diário Oficial da União, 20 de dezembro de 2006. p. 139-140.

BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials**. Fieldiana Zoology: New Series, 2004, 108p.
CABRAL, M. V. B. Síntese evolutiva dos marsupiais (Mammalia: Metatheria) evolutionary summary of the marsupials (Mammalia: Metatheria). **Revista Científica da FHO UNIARARAS**, v. 3, p. 73-84, 2015.

CÁCERES, N. C. Diet of three didelphid marsupials (Mammalia: Didelphimorphia) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, p. 430-433, 2004.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. Food habits, home range, and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, p. 85-92, 2001.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Reproductive biology of the common opossum, *Didelphis marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. **Brenesia**, v. 47, p. 117-122, 1997.

CALCHI, A. C. **Deteccção e caracterização molecular de agentes Anaplasmatceae em Xenarthra no Brasil**. 2020. 130 p. Tese (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2020.

CASAGRANDE, R. A.; DE OLIVEIRA CESAR, M.; HORTA, M. C.; ROSSI, S.; TEIXEIRA, R. H.; MATUSHIMA, E. R. Perfil hematológico de gambás *Didelphis aurita* e *D. albiventris* do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, p. 185-189, 2009.

CASTELLAW, A. H.; CHENNEY, E. F.; VARELA-STOKES, A. S. Tick-borne disease agents in various wildlife from Mississippi. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11 p. 439-442, 2011.

CASTRO, M. P. **Estudo da ocorrência de leptospiros em gambás da espécie *Didelphis aurita* que circulam no campus FIOCRUZ da Mata Atlântica (Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ)**. 2015. 44 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

CHEREM, J. J.; GRAIPEL, M. E.; MENEZES, M. E.; SOLDATELI, M. Observações sobre a biologia do gambá (*Didelphis marsupialis*) na Ilha de Ratones Grande, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v. 9, p. 47-56, 1996.

CICCULLI, V.; DECARREAUX, D.; AYHAN, N.; CASABIANCA, F.; DE LAMBALLERIE, X.; CHARREL, R.; FALCHI, A. Molecular screening of Anaplasmataceae in ticks collected from cattle in Corsica, France. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, p. 561-574, 2020.

CLARK, P.; SPENCER, P. B. S. Description of three new species of *Theileria* Bettencourt, Franca & Borges, 1907 from macropodoidea in western Australia. **Transactions of the Royal Society of South Australia**, v. 131, p. 100–106, 2007.

CLIFT, S. J.; STEYL, J. C.; MITCHELL, E. P.; LAWRENCE, J. A.; HOOIJBERG, E. H. Clinical and hematologic features of experimental theileriosis in roan calves (*Hippotragus equinus*). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, p. 1016-44, 2021.

COHEN, C.; SHEMESH, M.; GARRIDO, M.; MESSIKA, I.; EINAV, M.; KHOKHLOVA, I.; TASKER, S.; HAWLENA, H. Haemoplasmas in wild rodents: Routes of transmission and infection dynamics. **Molecular Ecology**, v. 27, p. 3714–3726, 2018.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 863–884, 2003.

COLLE, A. C.; MENDONÇA, R. F. B. MAIA, M. O.; FREITAS, L. C.; WITTER, R. W.; MARCILI, A.; AGUIAR, D. M.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; ROSSI, R. V.; PACHECO, R. C.. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 592-604, 2019.

CRUZ-SALAZAR B.; RUIZ-MONTOYA, L. Population viability analysis of common marsupials, *Didelphis marsupialis* and *Didelphis virginiana*, in a scenario of constant loss of native vegetation. **Mammalia**, v.1, p.1–8, 2020.

D'AGNONE A. S.; MORAIS, H. A. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Vet Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.

DA SERRA FREIRE, N. M. *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**, v. 26, p. 614–622, 1979.

DAHMANI, M.; DAVOUST, B.; TAHIR, D.; RAOULT, D.; FENOLLAR, F.; MEDIANNIKOV, O. Molecular investigation and phylogeny of Anaplasmataceae species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 302, 2017.

DE ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; DE CAMPOS, K. C. H.; TAKAHIRA, R. K. Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, p. 157-163, 2002.

DE SOUSA, K. C. M.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Anaplasmataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 145, p. 3424-3437, 2017.

DE SOUZA PAIVA, M. G.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAUJO, F. A. P.; DA SILVA, N. R. S. Identificação do *Didelphis marsupialis* como hospedeiro experimental de *Babesia bovis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 511-513, 1991.

DELICIELLOS, A. C.; LORETTO, D.; ANTUNES, V. Z. Marsupiais na Mata Atlântica. **Ciência Hoje**, v. 38, p. 66-69, 2006.

DIAS, G. B.; AMARAL, R. B.; GATTO, I. R. H.; LAPERA, I. M.; OLIVEIRA, L. G.; HOPPE, E. G. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in

captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.63, p. 94-96, 2019.

DO, T.; PHOOSANGWALTHONG, P.; KAMYINGKIRD, K.; KENGRADOMKIJ, C.; CHIMNOI, W.; INPANKAEW, T. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Stray Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Ticks from Bangkok, Thailand. **Pathogens**, v. 10, p. 561, 2021.

DONAHOE, S.; PEACOCK, C.; CHOO, A.; COOK, R.; O'DONOGHUE, P.; CRAMERI, S.; VOGELNEST, L.; GORDON, A. N.; SCOTT, J. L.; ROSE, K. A retrospective study of *Babesia macropus* associated with morbidity and mortality in eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) and agile wallabies (*Macropus agilis*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 268–76, 2015.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G.A.; PALMER, G. H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent's subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EICHENBERGER, R. M.; RAMAKRISHNAN, C.; RUSSO, G.; DEPLAZES, P.; HEHL, A. B. Genome-wide analysis of gene expression and protein secretion of *Babesia canis* during virulent infection identifies potential pathogenicity factors. **Scientific Reports**, v. 7, p.3357, 2017.

EIRAS, D.; CRAVIOTTO, M.; BANETH, G.; MORÉ, G. First report of *Rangelia vitali* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitology International**, v. 63, p. 729-234, 2014.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1999. 609 p.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: A field guide**. 2^a ed. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 307p.

ESHOO, M. W.; CAROLAN, H. E.; MASSIRE, C.; CHOU, D. M.; CROWDER, C. D.; ROUNDS, M. A.; PHILLIPSON, C. A.; SCHUTZER, S. E.; ECKER, D. J. Survey of *Ixodes pacificus* Ticks in California Reveals a Diversity of Microorganisms and a Novel and Widespread Anaplasmataceae Species. **Plos One**, v. 10, e0135828, 2015.

FELDER, K. M.; HOELZLE1, K.; RITZMANN, M.; KILCHLING, T.; SCHIELE, D.; HEINRITZI, K.; GROEBEL, K.; HOELZLE, L. E. Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 27, p. 557-564, 2011.

FERREIRA, E. C.; GONTIJO, C. M.; CRUZ, I.; MELO, M. N.; SILVA, A. M. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memorial do Instituto**

Oswaldo Cruz, v. 105, p. 895–898, 2010.

FELDER, K. M.; HOELZLE, K.; RITZMANN, M.; KILCHLING, T.; SCHIELE, D.; HEINRITZI, K.; GROEBEL, K.; HOELZLE, L. E. Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 27, p. 557-564, 2011.

FIGUEIREDO, C. S. **Padrões de interações entre humanos e animais silvestres no Rio de Janeiro, uma megacidade no hotspot de biodiversidade da Mata Atlântica**. 2019. 59f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

FONSECA, G. A. B.; HERMAN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. Lista anotada dos mamíferos brasileiros. **Occasional papers in conservation biology**, v. 4, p. 1-38, 1996.

FURUTA, P. I.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; ROCHA, A. G.; MACHADO, R. Z.; TINUCCICOSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 41-45, 2009.

GARDNER, A. L. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M.(eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**, 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p. 3-18.

GARDNER, A. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. **Special Collections of Texas Tech Libraries**, v. 4, p. 1-81, 1973.

GARY, A. T.; RICHMOND, H. L.; TASKER, S.; HACKETT, T. B.; LAPPIN M. R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the blood of cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 321 – 326, 2006.

GATTO, I. R. H.; SONÁLIO, K.; AMARAL, R. B.; MORÉS, N.; COSTA, O. A. D.; ANDRÉ, M. R.; OLIVEIRA, L. G. High frequency and molecular characterization of porcine hemotrophic mycoplasmas in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 33-39, 2019.

GILBERT, L. The impacts of climate change on ticks and tick-borne disease risk. **Annual Review of Entomology**, v. 66, p. 373-388, 2021.

GOMPPER, M. E. (2014). **Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation**, 1st. ed. Oxford: Oxford University Press, 2014. 305p.

GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 137 p. Tese (Doutorado em Saúde Animal). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2006.

GONÇALVES, L. R.; HERRERA, H. M.; NANTES, W. A. G.; SANTOS, F. M.; PORFÍRIO, G. E. O.; BARRETO, W. T. G.; MACEDO, G. C.; ASSIS, W. O.; CAMPOS, J. B. V.; SILVA, T. M. V.; MARIANO, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.

Genetic diversity and lack of molecular evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals from Central-Western Brazil. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105303, 2020.

GONÇALVES, L. R.; PALUDO, G.; BISOL, T. B.; PERLES, L.; DE OLIVEIRA, L. B.; DE OLIVEIRA, C. M.; SILVA, T. M. V.; NANTES, W. A. G.; DUARTE, M. A.; SANTOS, F. M.; PORFÍRIO, G. E. O.; HIRANO, L. Q.; HERRERA, H. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with the phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). **Parasitology Research**, p.1-10, 2021.

GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L. R.; MATOS, C. A.; DE JESUS FERNANDES, S.; OLMOS, I. D. F.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversity and molecular characterization of novel hemoplasmas infecting wild rodents from different Brazilian biomes. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 43, p. 50-56, 2015.

GRAIPEL, M. E.; SANTOS-FILHOS, M. Reprodução e dinâmica populacional de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied (Mammalia: Didelphimorphia) em ambiente periurbano na Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Biotemas**, v. 19, p. 65-73, 2006.

GUIMARÃES, A. **Diagnóstico Morfológico, Sorológico e Molecular de Agentes Anaplasmatáceas em Felinos Domésticos da Região Metropolitana do Rio**. 2013. 79 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, 2013.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J. M.; SILVA, A. T. D.; CARPINTERO, F. M.; PIRES, J. R.; BENEVENUTE, J. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 140-144, 2018.

GÜRTLER R. E.; CARDINAL M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, p. 32–50, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1309–1318, 2005.

HARVEY, J. W. **Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals**. Philadelphia: Elsevier, 2001. 228 p.

HARVEY, J. W. Disorders of bone marrow. In: Harvey JW. **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. 260–318p.

HE, L.; MIAO, X.; HU, J.; HUANG, Y.; HE, P.; HE, J.; YU, L.; MALOBI, N.; SHI, L.; ZHAO, J. First Molecular Detection of *Babesia gibsoni* in Dogs from Wuhan, China. **Frontiers in Microbiology**, v.21, p. 1577, 2017.

HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. *Didelphis marsupialis*: reservoir of *Babesia brasiliensis* in the valley of Caracas (Venezuela). **Acta Científica Venezolana**, v. 42, p. 45–46, 1991.

HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. S. P.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M. T.; BONAMIGO, R. A.; TASSO, N. J. R.; OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, p. 470-472, 2012.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4219–4221, 2000.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia:Lea & Febger, 1993. 417p.
JALOVECKA, M.; SOJKA, D.; ASCENCIO, M.; SCHNITTGER, L. *Babesia* life cycle—when phylogeny meets biology. **Trends in parasitology**, v. 35, p. 356-368, 2019.

JANSEN, A. M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1.ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. cap.22, p.167-173.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.; JARDINE, J.; BROUGHTON, D. K.; ID ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J. Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. **Australian veterinary journal**, v. 85, p. 459-463, 2007.

KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; KINDEN, D. A. The pathology of experimental cytauxzoonosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.97, p. 416-432, 1987.

KOČÍKOVÁ, B.; MAJLÁTH, I.; VÍCHOVÁ, B.; MALINIČOVÁ, L.; PRISTAŠ, P.; CONNORS, V. A.; MAJLÁTHOVÁ, V. ‘*Candidatus Cryptoplasma*’ Associated with Green Lizards and *Ixodes ricinus* Ticks, Slovakia, 2004–2011. **Emerging infectious diseases**, v. 24, p. 2348, 2018.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as the source of zoonotic infections. **Emerging infectious diseases**, v. 10, p. 2067, 2004.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LACERDA, N. P.; SOUTO, P. C.; DIAS, R. S.; SOUTO, L. S.; SOUTO, J. S. Percepção dos residentes sobre a arborização da cidade de São José de Piranhas–PB. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 5, p. 81–95, 2010.

LANGE, R. B.; JABLONSKI, E. Mammalia do Estado do Paraná, Marsupialia. **Estudos de Biologia**, v. 43, p. 15-224, 1998.

LASHNITS, E.; GRANT, S.; THOMAS, B.; QUROLLO, B.; BREITSCHWERDT, E.B. Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*, but not *Ehrlichia ewingii*, in a dog. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, p. 1747-1752, 2019.

LEE, H. A.; MOON, M. N.; WON, J. S.; IM, E. K.; YOO, J. H.; KIM, O. Detection and identification of *Mycoplasma* species by multiplex PCR in cats. **Journal of Biomedical and Translational Research**, v. 19, p. 16-20, 2018.

LEE, J. Y.; RYAN, U. M.; JEFFERIES, R.; MCINNES, L. M.; FORSHAW, D.; FRIEND, J. A.; IRWIN, P. J. *Theileria gilberti* n. sp (Apicomplexa: Theileriidae) in the Gilbert's Potoroo (*Potorous gilbertii*). **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 290–295, 2009.

LIN, M.; XIONG, Q.; CHUNG, M.; DAUGHERTY, S. C.; NAGARAJ, S.; SENGAMALAY, N.; OTT, S.; GODINEZ, A.; TALLON, L. J.; SADZEWICZ, L.; FRASER, C.; DUNNING HOTOPP, J. C.; RIKIHISA, Y. Comparative Analysis of Genome of *Ehrlichia* sp. HF, a Model Bacterium to Study Fatal Human Ehrlichiosis. **BMC Genomics**, v.22, p. 11, 2021.

LINS, L.; S FEIJO, L.; FREY, F.; ZAMBRANO, C.; BERNE, M.; NOGUEIRA, C. Presença de *Sarcocystis* spp. em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* na região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, p. 126-128, 2011.
LOCKHART, J. M.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; DAWSON, J. E.; LITTLE, S. E. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in the piedmont physiographic province of Georgia. **The Journal of parasitology**, v. 83, p. 887-894, 1997.

LONGDON, B.; BROCKHURST, M.; RUSSELL, C.; WELCH, J. J.; JIGGINS, F. M. (2014) The evolution and genetics of virus-host shifts. **PLOS Pathogens**, v. 10, e1004395, 2014.

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

MACIEIRA, D. B. **Hemoplasmas em gatos domésticos: Prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus das imunodeficiência e/ou leucemia felinas**. 2008. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

MAGGI, R. G.; COMPTON, S. M.; TRULL, C. L.; MASCARELLI, P. E.; MOZAYENI, B. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 3237-3241, 2013.

MALTA, M. C. C.; LUPPI, M. M. Marsupialia - Didelmorphia (Gambá, Cuíca). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo:Editora Roca, 2007. p.340-357.

MASSINI, P. F.; DROZINO, R. N.; OTOMURA, F. H.; MONGRUEL, A. C. B.; VALENTE, J. D. M.; TOLEDO, M. J. O.; MARTINS, T. F.; VIDOTTO, O.; WISCHRAL, T. S.; VIEIRA, J. Detection of Hemotropic *Mycoplasma* sp. in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 797-801, 2019.

MCKEEVER, D. J. Bovine immunity – a driver for diversity in *Theileria* parasites? **Trends Parasitology**, v. 25, p. 269–276, 2009.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. **Advances in Parasitology**, v. 37, p.103, 1985.

MELO, A. L. T., AGUIAR, D. M. D., SPOLIDORIO, M. G., YOSHINARI, N. H., MATUSHIMA, E. R., LABRUNA, M. B., & HORTA, M. C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25, p. 348-352, 2016.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, p.2–13, 2004.

MESSICK, J.B.; BERENT, L. M.; EHRHART, E. J.; WASMER, C. C. Light and electron microscopic features of Eperythrozoon-like parasites in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, p. 240-243, 2000.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p.335-350, 1987.

MUNSON, L.; TERIO, K.; KOCK, R.; MLENGEYA, T.; MLENGEYA, T.; ROELKE M, et al. Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. **PLoS ONE**, v. 2008;3:e2545.

MUSEUX, K.; BORETTI, F. S.; WILLI, B.; RIOND, B.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E.; WITTENBRINK, M. M.; TASKER, S.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. In vivo transmission studies of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 40, p. 45, 2009.

NAKAJIMA, R.; TSUJI, M.; ODA, K.; ZAMOTO-NIIKURA, A.; WEI, Q.; KAWABUCHI-KURATA, T.; NISHIDA, A.; ISHIHARA, C. *Babesia microti*-group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of the CCTeta gene in 36 isolates. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, p. 55–68, 2009.

NANTES, W. A. G.; BARRETO, W. T. G.; SANTOS, F. M.; MACEDO, G. C.; RUCCO, A. C.; ASSIS, W. O.; PORFÍRIO, G. E. O.; ANDRADE, G. B.; JANSEN, A. M.; HERRERA, H. M. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 16-20, 2019.

NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.

- NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 891 – 899, 2001.
- NOMURA, H. **Os mamíferos no folclore**. Mossoró:Fundação Vingt-un Rosado, 1996. 146 p.
- NORVAL, R. A. I.; PERRY, B. D.; YOUNG, A. S. **The Epidemiology of Theileriosis in Africa**. 1st edn. London, Academic Press, 1992. 481p.
- NOWAK, R. M.; WALKER, E. P. **Walker's Mammals of the World**. Washington: Johns Hopkins University Press press, 1999. 215p.
- OTIENDE, M. Y.; KIVATA, M. W.; MAKUMI, J. N.; MUTINDA, M. N.; OKUN, D.; KARIUKI, L.; OBANDA, V.; GAKUYA, F., MIJELE, D.; SORIGUER, R. C.; ALASAAD, S. Epidemiology of *Theileria bicornis* among black and white rhinoceros metapopulation in Kenya. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 1-7, 2015.
- PAPARINI, A.; MACGREGOR, J.; RYAN, U. M.; IRWIN, P.J. First Molecular Characterization of *Theileria ornithorhynchi* Mackerras, 1959: yet Another 462 Challenge to the Systematics of the Piroplasms. **Protist**, v. 166, p. 609–620, 2015.
- PASSAMANI, M. Análise da comunidade de marsupiais em Mata Atlântica de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 11/12, p. 215-228, 2000.
- PENZHORN, B. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 11-21, 2006.
- PEREIRA, A. M. **Detecção sorológica, molecular e análise filogenética de membros da Família Anaplasmataceae em cães naturalmente infectados no Rio de Janeiro**. 2012. 131 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2012.
- PITEL, P. H.; PRONOST, S.; SCRIVE, T.; LÉON, A.; RICHARD, E.; FORTIER, G. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. **Veterinary parasitology**, v. 170, p. 182-184, 2010.
- PONTAROLO, G. H.; KÜHL, L. F.; PEDRASSANI, D.; CAMPOS, M. C.; FIGUEIREDO, F. B.; VALENTE, J. D. M.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; WISCHRAL, T. S.; VIEIRA, J.; VIEIRA, R. F. C.; BARROS-FILHOS, I. R. 'Candidatus *Mycoplasma haemoalbiventris*', a novel hemoplasma species in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, p. 565-572, 2021.
- RAMOS, C. A.; RAMOS, R. A.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES, D. S. J. R.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 58-62, 2009.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma, Ehrlichia, and 'Candidatus Neoehrlichia' bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review.* **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 842-1861, 2011.

RAZIN, S., YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.1094-1156,1998.

REIG, O. A. **Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur.** Monografía (Naturae) - Museo Municipal de Ciencias Naturales Lorenzo Scaglia, Buenos Aires, Argentina, 1981. 162p.

RELLER, M.; DUMLER, J. Development and Clinical Validation of a Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay for Human Infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 3, p. 14, 2018.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobarton ellamuris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, C. A.; BERISTAIN-RUIZ, D. M.; OLIVARES-MUÑOZ, A.; QUEZADA-CASASOLA, A.; PÉREZ-CASIO, F.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. A.; TAPIA-ALANÍS, J.; LIRA-AMAYA, J. J.; RIVERA-BARRENO, R.; CERA-HURTADO, O. S.; BANCOVICH-CAMARILLO, J. A.; LUIS SOON-GÓMEZ, L.; ADAME-GALLEGOS, J. R.; FIGUEROA-MILLÁN, J. V. Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-7, 2020.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZUTKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROELLIG, D. M.; ELLIS, A. E.; YABSLEY, M. J. Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **International journal for parasitology**, v. 39, p. 1603-1610, 2009.

ROJERO-VAZQUEZ, E.; GORDILLO-PÉREZ, G.; WEBER, M. Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in opossums and dogs in Campeche, Mexico: the role of tick infestation. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 5, p. 161, 2017.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. 2006. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Edifurb, 2006. p.27-66.

SALVADOR, C. H.; GRAIPEL, M. E.; SIMÕES-LOPES, P.C. Body size of common opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) on southern Brazilian islands. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 311-317, 2009.

SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J. C.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phiX174 DNA. **Nature**, v. 265, p. 687-695, 1977.

SANTIAGO, M. E. B. **Investigação de *Leishmania* spp. em *Didelphis* spp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo**. 2007. 62 p. Tese (mestrado) Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho. Botucatu, São Paulo, 2007.

SANTOS, E. **Entre o gambá e o macaco**. Belo Horizonte: Editora Itatiaia, 1984. 287p.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. Babesia: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1788-1809, 2012.

SHARKEY, L. C.; HILL, S. A. Structure of bone marrow. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010. 8-13p.

SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, p.193-209, 2001.

SHI, H.; DUAN, L.; LIU, F.; HU, Y.; SHI, Z.; CHEN, X.; YANG, H.; YAN, B.; YAO, L. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks as reservoir and vector of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in China. **Veterinary parasitology**, v. 274, p. 108929, 2019.

SHOCK, B. C.; MONCAYOC, A.; COHEN, S.; MITCHELL, E. A.; WILLIAMSON, P. C.; LOPEZ, G.; GARRISON, L. E.; YABSLEY, M. J. Diversity of piroplasms detected in blood-fed and questing ticks from several states in the United States. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, p. 373-380, 2014.

SOARES, H. S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; MINERVINO, A. H.; MOREIRA, T. R.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 2, p. 115-121, 2017.

SOKOLI, A.; GROEBEL, K.; HOELZLE, K. AMSELGRUBER, W. M.; MATEOS, J. M.; SCHNEIDER, M. K.; ZIEGLER, U.; FELDER, K. M.; HOELZL, L. E. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma. **Veterinary Research**, v. 44, p.1-12, 2013.

SOLA, M. C. **Emprego da técnica de PCR em Tempo Real na detecção de DNA de *Brucella* spp em lesões de carcaças e vísceras provenientes de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2011.

SOLARI, S. A new species of Monodelphis (Didelphimorphia: Didelphidae) from southeastern Peru. **Mammalian Biology**, v. 69, p. 145-152, 2004.

SUDAN, V.; SHANKAR, D.; SHARMA, B.; JAISWAL, A. K.; SINGH, A. Molecular characterization and sequence phylogenetic analysis of *Babesia bigemina* cattle isolate from Mathura based on 18S ribosomal DNA gene. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 87, p. 977-979, 2017.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARDIEU, L.; ROLLOCK, W.; GARCIA, G. W. Wildlife rehabilitation: A case study of the neo-tropical, opossum *Didelphis marsupialis insularis*, Allen 1902. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 529-534, 2020.

TASKER, S.; PETERS, I. R.; MUMFORD, A. D.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; DAY, S.; PRETORIUS, A. M.; BIRTLES, R. J.; HELPS, C. R.; NEIMARK, H. Investigation of human haemotropic Mycoplasma infections using a novel generic haemoplasma Qpcr assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1285-1292, 2010.

TASKER, Séverine. Hemotropic Mycoplasma. In: BRUYETTE, D. **Clinical Small Animal Internal Medicine**. Ed. John Wiley & Sons, 2020, p. 927-930.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. 2^oEd. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. John Wiley & Sons, 2012, 678p.

TROSKIE, M.; DE VILLIERS, L.; LEISEWITZ, A.; OOSTHUIZEN, M. C.; QUAN, M. Development and validation of a multiplex, real-time PCR assay for *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, p. 421-432, 2019.

UETI, M. W.; KNOWLES, D. P.; DAVITT, C. M.; SCOLES, G. A.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 77, p.70–75, 2009.

UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 3–10, 2006.

VIEIRA, L. L.; CANEVERA, M. F.; CARDOZO, L. L.; CARDOSO, C. P.; HERKENHOFF, M. E.; NETO, A. T.; GANZ, C. I. V.; MILETTIA, L. C. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 6, p. e00114, 2019.

VIEIRA, M. V. Body size and form in two Neotropical marsupials, *Didelphis aurita* and *Philander opossum* (Marsupialia:Didelphidae). **Mammalia**. v. 61, p. 245-254, 1997.

- VIEIRA, R. F. C.; MOLENTO, B. M.; SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; SANTOS, A. P.; GUIMARAES, A. M. S.; MOHAMED, A.; BARROS-FILHOS, I. R.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary microbiology**, v. 139, p. 410-413, 2009.
- VOLOKHOV, D. V.; HWANG, J.; CHIZHIKOV, V. E.; DANACEAU, H.; GOTTDENKER, N. L. Prevalence, genotype richness, and coinfection patterns of hemotropic mycoplasmas in raccoons (*Procyon lotor*) on environmentally protected and urbanized barrier islands. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, p. e00211-217, 2017.
- VOSS, R. S.; GARDNER, A. L.; JANSA, S. A. On the relationships of “Marmosa” formosa Shamel, 1930 (Marsupialia: Didelphidae), a phylogenetic puzzle from the Chaco of northern Argentina. **American Museum Novitates**. v. 3442, p. 1-18, 2004a.
- VOSS, R. S.; LUNDE, D. P.; JANSA, S. A. On the contents of *Gracilinanus gardner* and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. **American Museum Novitates**, v. 3482, p. 1-34, 2005.
- WEISS, E.; MOULDER, J. W. **Order I. Rickettsiales**, Gieszczykiewick 1939, 25AL. N.R. Krieg (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore: v.1, p.687-727, 1984.
- WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 961 – 969, 2006b.
- WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, p. 449-456, 2016.
- YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. Natural history of zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 22, p. 18-31, 2013.
- YAMASAKI, M.; TAJIMA, M.; LEE, K. W.; JEONG, J. R.; YAMATO, O.; MAEDE, Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 123–129, 2002.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO I - Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76330-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:04:44	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Divan Baldani	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção de Agentes Anaplasmatóceas em amostras de sangue periférico e de medula óssea de gambás (<i>Didelphis sp.</i>) da região metropolitana do Rio de Janeiro	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das amostras de sangue e de medula óssea de gambás (<i>Didelphis sp.</i>) resgatados	10/2020	03/2022
2	Avaliação dos esfregaços de sangue periférico	10/2020	10/2021
3	Avaliação citológica da medula óssea	11/2020	07/2022
4	Extração de DNA das amostras	04/2021	06/2022
5	Reações de PCR para detecção de Agentes Anaplasmatóceas	07/2021	07/2022
6	Análise dos dados	10/2021	10/2022
7	Divulgação dos resultados em congressos e publicações	10/2022	12/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Agatha Ferreira Xavier de Oliveira	Coleta e execução de análises	158.445.547-01	Brasileira
2	Naiara Vidal Stocco	Coleta e execução das análises	957.031.522-91	Brasileira
3	Anieli Vidal Stocco	Contenção e manejo clínico dos animais	957.031.602-00	Brasileira
4	ELISABETH NEVES MUREB	Apoio nas análises hematológicas	131.299.247-60	Brasileira
5	Juliana Macedo Raimundo	Apoio nas análises moleculares	058.862.347-48	Brasileira
6	Andresa Guimaraes	Apoio nas análises moleculares	116.295.977-08	Brasileira
7	Gracy Canto Gomes Marcello	Apoio nas análises de medula óssea	094.329.057-05	Brasileira
8	Daniel de Almeida Balthazar	Contenção e manejo clínico dos animais	072.247.147-55	Brasileira
9	Bruna Emely Pereira Barbosa	Contenção e manejo clínico dos animais	142.265.347-19	Brasileira
10	Marcos Rogério André	Apoio nas análises moleculares para Agentes Anaplasmatóceas	302.435.148-59	Brasileira
11	JEFERSON ROCHA PIRES	Contenção e manejo clínico dos animais	055.490.267-24	Brasileira
12	Alexandre Carvalho Costa	Apoio nas análises hematológicas	116.471.937-88	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

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

Código de autenticação: 0763300120201008

Página 1/4

6.2 ANEXO II – Aprovação CEUA/UNESA



Estácio

**Universidade Estácio de Sá
Comissão de Ética no Uso de Animais**

Certificamos que o protocolo nº009/2021 de ensino da disciplina "**Pesquisa de infecções por hemoparasitas de importância humana e animal em gambás (*Didelphis sp.*) da região metropolitana do Rio de Janeiro**", sob a responsabilidade da Professora **Andresa Guimarães**, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 08 de dezembro de 2021. Este protocolo tem validade de um ano a contar desta data.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2021

Luciana de Paula Lima Schmidt de Andrade
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estácio de Sá