

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E
PARASITOLOGIA**



Tese

**Protozoários (Apicomplexa) de importância em saúde pública e sanidade
animal de mamíferos silvestres do extremo sul do Brasil**

Simone Scheer

Pelotas, 2022

Simone Scheer

**Protozoários de importância em saúde pública e sanidade animal de
mamíferos silvestres do extremo sul do Brasil**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Microbiologia e Parasitologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção
do título de Doutora em Ciências
Biológicas (área do
conhecimento: Parasitologia)

Orientadora: Profa. Dra. Gertrud Müller Antunes
Coorientadora: Márcia Raquel Pegoraro de Macedo

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S314p Scheer, Simone

Protozoários (apicomplexa) de importância em saúde pública e sanidade animal de mamíferos silvestres do extremo sul do Brasil / Simone Scheer ; Gertrud Müller, orientadora ; Márcia Pegoraro de Macedo, coorientadora. — Pelotas, 2022.
67 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. *Neospora caninum*. 2. *Babesia sp.*. 3. *Theileria sp.*. 4. Mamíferos silvestres. I. Müller, Gertrud, orient. II. Macedo, Márcia Pegoraro de, coorient. III. Título.

CDD : 616.016

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB:
10/901

Simone Scheer

**Protozoários de importância em saúde pública e sanidade animal de
mamíferos silvestres do extremo sul do Brasil**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31/05/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

Profa. Dra. Camila Belmonte Oliveira
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria- UFSM

Profa. Dra. Gertrud Müller (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

Dra. Thainá Dutra Vieira Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas- UFPel

Profa. Dra. Márcia Pegoraro de Macedo Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas- UFPel

Dra. Fabiana Fedatto Bernardon (Suplente)
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas- UFPel

Dedico este trabalho ao meu pai (Armando Scheer, *in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço a toda minha família pelo incentivo, apoio e força para seguir em frente e buscar meus objetivos.

À minha orientadora Gertrud, pela oportunidade, confiança e incentivo no meu trabalho.

À minha coorientadora Márcia, por todos os ensinamentos, paciência, risadas durante todos esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, obrigada à cada um pelo convívio e troca de aprendizados.

Ao meu namorado Maico Bittencourt pelo apoio e incentivo para a conclusão desse trabalho.

Ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres da UFPel pela doação do material utilizado no estudo, em especial ao Ms. Biol. Marco Antônio pela dedicação.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia pela oportunidade e a CAPES pelo apoio financeiro. A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a finalização desse trabalho.

Muito obrigada!!!

“ Vá firme na direção das suas metas, porque o pensamento cria, o desejo atrai e a fé realiza..”

(Trevisian. L)

Resumo

SCHEER, Simone. **Protozoários de importância em saúde pública e sanidade animal de mamíferos silvestres do extremo sul do Brasil**. 2022. 67f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas)- Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

A convivência entre animais domésticos e silvestres pode ocasionar riscos de infecções causadas por protozoários. A identificação de reservatórios selvagens contribui para o entendimento da dinâmica das populações de protozoários encontradas em diferentes hospedeiros, assim como a identificação de agentes parasitários com potencial zoonótico. Portanto, o objetivo desse estudo foi detectar protozoários com potencial zoonótico (*Babesia*, *Theileria* sp. e *Neospora caninum*) em mamíferos do Rio Grande do Sul. Foram coletados os tecidos do baço de 72 animais (50 *Didelphis albiventris*, 10 *Cavia aperea*, 4 *Galictis cuja* e 8 *Procyon cancrivorus*) atropelados em rodovias do Rio Grande do Sul, oriundos dos municípios de São Lourenço do Sul, Pelotas, Capão do Leão e Arroio Grande, nos períodos entre janeiro de 2015 a abril de 2019, de acordo com licença concedida pelo ICMBio/SISBIO, alguns espécimes foram doados pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre da Universidade Federal de Pelotas (NURFS). Para a extração de DNA foi utilizado o baço dos mamíferos. O processo de extração foi realizado utilizando o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e teve sua pureza conhecida através de espectrofotometria. Para as Reações da Polimerase em Cadeia foram utilizados os primers da subunidade 18S do DNA ribossômico. *N. caninum* e *Babesia microti* apresentaram ocorrência em *C. aperea* e *Babesia* spp. em *P. cancrivorus*. Esses são os primeiros registros no Brasil, desses protozoários para os hospedeiros através de estudos moleculares. *Babesia* sp. e *T. equi* foram encontradas em *D. albiventris*, sendo este o primeiro relato de *T. equi* nesse hospedeiro no Brasil.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; *Babesia* sp.; *Theileria* sp.; mamíferos silvestres.

Abstract

SCHEER, Simone. Protozoa of importance in public health and animal health of wild mammals from the extreme South of Brazil. Thesis (Doctor in Sciences)- **Post- graduation Program of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas 2022. 67f.**

The coexistence between domestic and wild animals can cause risks of infections caused by protozoa. The identification of wild reservoirs contributes to the understanding of the dynamics of protozoan populations found in different hosts, as well as the identification of parasitic agents with zoonotic potential. Therefore, the objective of this study was to detect protozoa with zoonotic potential (*Babesia*, *Theileria* sp. and *Neospora caninum*) in mammals from Rio Grande do Sul. Spleen tissues were collected from 72 animals (50 *Didelphis albiventris*, 10 *Cavia aperea*, 4 *Galictis cuja* and 8 *Procyon cancrivorus*) run over on highways in Rio Grande do Sul, from the municipalities of São Lourenço do Sul, Pelotas, Capão do Leão and Arroio Grande, in the periods between January 2015 and April 2019, according to a license granted by ICMBio/SISBIO, some specimens were donated by the Nucleus for Rehabilitation of Wild Fauna of the Federal University of Pelotas (NURFS). For DNA extraction, the spleen of mammals was used. The extraction process was performed using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. The DNA was quantified and its purity was known by spectrophotometry. For the Polymerase Chain Reactions, primers from the 18S subunit of the ribosomal DNA were used. *N. caninum* and *Babesia microti* were found in *Cavia aperea* and *Babesia* spp. in *Procyon cancrivorus*. These are the first records in Brazil of these protozoa to their hosts through molecular studies. *Babesia* sp. and *T. equi* were found in *D. albiventris*, this being the first report of *T. equi* in this host in Brazil.

Keywords: *Neospora caninum*; *Babesia* sp.; *Theileria* sp.; wild mammals.

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Didelphis albiventris</i>	16
Figura 2 <i>Procyon cancrivorus</i>	17
Figura 3 <i>Cavia aperea</i>	18
Figura 4 <i>Galictis cuja</i>	19
Figura 5 Necropsia de <i>Didelphis albiventris</i>	23

Lista de Tabelas

Tabela 1	Regiões alvo e primers utilizados nas amplificações de DNA de <i>Babesia</i> , <i>Theileria sp.</i> e <i>Neospora caninum</i>	25
----------	---	----

Lista de Tabela Manuscrito

Tabela 1 Códigos das sequências de <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia</i> sp. obtidas de <i>Didelphis albiventris</i> (baço) e valores de homologia de acordo com o Blast no Genbank.....	30
---	----

Sumário

1. Introdução	27
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
3. Revisão de Literatura	29
3.1 Hospedeiros Silvestres.....	29
3.1.1 <i>Didelphis albiventris</i> Lund, 1840.....	29
3.1.2 <i>Procyon cancrivorus</i> (Cuvier, 1798)	30
3.1.3 <i>Cavia aperea</i> Erxleben, 1777	30
3.1.4 <i>Galictis cuja</i> (Molina, 1782)	31
3.2.1 <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i>	32
3.2. 2 <i>Neospora caninum</i> Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988....	34
4. Material e Métodos	36
4.1 Coleta dos hospedeiros.....	36
4.2 Procedimentos para a Extração de DNA.....	36
4.3 Reações de PCR.....	37
4.4 Purificação e sequenciamento	38
4.5 Análises das sequências	38
5. Manuscrito.....	39
Referências Bibliográficas	49
Apêndice.....	48
Apêndice 1: Artigo: Molecular Analysis on Protozoa in Wild Mammals Run Over in Southern Rio Grande do Sul, Brazil.....	49
Anexo A: Autorização do ICMBio para coleta de animais atropelados... 74	Anexo
B: Normas Brazilian Journal of Development.....	66
Anexo C: Comprovação de publicação do artigo.....	67

1. Introdução

A convivência entre animais domésticos e silvestres, comum em praticamente todos os países, pode ocasionar riscos de infecções causadas por protozoários, tanto para os animais silvestres quanto para os domésticos, podendo ambos tornarem-se susceptíveis ou reservatórios desses microrganismos (DUARTE, 2007).

A emergência destas doenças representa novos desafios para a medicina humana e veterinária. Tais enfermidades estão ampliando sua distribuição geográfica, devido a mudanças climáticas e acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais. A presença de animais domésticos em ambientes selvagens tem resultado em uma associação cada vez mais íntima entre reservatórios selvagens e vetores com o ser humano e animais domésticos. (HUNFELD et al., 2008).

A identificação de reservatórios selvagens para os protozoários ajudaria no entendimento da epidemiologia das enfermidades por eles causadas, principalmente aquelas de caráter zoonótico. Esses achados ressaltam a necessidade de estudos mais aprofundados no que diz respeito à epidemiologia dos vetores, reservatórios e agentes envolvidos nestas enfermidades. Em relação aos protozoários transmitidos por vetores, é de real importância à caracterização molecular destes agentes entre os animais selvagens e domésticos, em função da similaridade morfológica verificada entre os mesmos (ANDRÉ, 2011).

Os atropelamentos de animais silvestres correspondem a segunda maior causa de perda de biodiversidade, ficando atrás apenas da redução de ambientes naturais. Mortalidades por atropelamento tem sido um fator de pressão impactante para populações nativas ou ameaçadas de extinção (CHEREM et al., 2007). De acordo com o Departamento Nacional de Estradas e Rodagem/Instituto Militar de Engenharia (DNER/IME, 2001) 475 milhões de animais são atropelados por ano no país. Esses animais podem servir como fonte para estudos de diagnóstico, epidemiologia, dieta, e fauna parasitária.

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *Babesia* spp. *Theileria* sp. e *Neospora caninum* em mamíferos do Rio Grande do Sul, através da utilização de técnicas moleculares.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Investigar a presença de protozoários de potencial zoonótico em mamíferos silvestres (*Didelphis albiventris*, *Cavia aperea*, *Galictis cuja* e *Procyon cancrivorus*) do Rio Grande do Sul.

2. 2 Objetivos específicos:

- Verificar ocorrência de *Babesia* spp, *Theileria* sp e *Neospora caninum* em (*Didelphis albiventris*, *Cavia aperea*, *Galictis cuja* e *Procyon cancrivorus*);
- Registrar novas ocorrências de protozoários em mamíferos silvestres;

3. Revisão de Literatura

3.1 Hospedeiros Silvestres

3.1.1 *Didelphis albiventris* Lund, 1840

Didelphis albiventris (Didelphidae) (Figura 1), conhecido como gambá-de-orelha-branca possui uma coloração grisalha, médio porte, orelhas com a base negra, três listras pretas na cabeça, uma central no topo da cabeça e duas sobre olhos. A espécie é distribuída na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Estes mamíferos alimentam-se de frutos, insetos, pequenos roedores, anfíbios, e pequenos répteis (CÁCERES, 2002). Habitam florestas, mas também podem ser encontrados em formações arbustivas e campestres, áreas rurais, e até mesmo em ambientes urbanos utilizando o forro das moradias como tocas. São animais que se adaptam facilmente à presença humana (GONÇALVES et al., 2014). Por esta razão, são encontrados com maior abundância, próximos de estradas e residências, onde é comum serem mortos por atropelamento ou ataque de cães.



Figura 1- *Didelphis albiventris*
Fonte: Jairo Souza Jr

3.1.2 *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1798)

Procyon cancrivorus (Procyonidae) (Figura 2), cujo nome popular é mão-pelada, são animais de médio porte. Eles têm pelagem que varia do cinza claro ao escuro no dorso, com tons mais claros no ventre, apresenta uma região de pelos escuros ao redor dos olhos e anéis de pelos escuros na cauda (GONÇALVES et al., 2014). Tem uma ampla distribuição geográfica, desde a América Central até América do Sul, (REID e HELGEN 2008). No Brasil, ocorre em todos os biomas, podendo ser encontrados em ambientes como campos, florestas, e próximos a rodovias. São animais de hábitos noturnos.

Estes mamíferos alimentam-se de frutos, pequenos roedores, anfíbios, peixes, moluscos, insetos e crustáceos (GATTI et al., 2006).



Figura 2- *Procyon cancrivorus*
Fonte: <https://br.pinterest.com>

3.1.3 *Cavia aperea* Erxleben, 1777

Cavia (Caviidae) é composto por nove espécies endêmicas na América do Sul, dispersas em grande parte do continente, com exceção da Amazônia e das regiões do Chile e Argentina. No Brasil, são encontradas quatro espécies: *Cavia aperea*, *Cavia fulgida*, *Cavia magna* e *Cavia intermedia* (PAGLIA et al., 2012)

Cavia aperea (Figura 3), de nome popular preá, possui a coloração do dorso variando de castanho-escuro ao cinza-claro, com tons amarelados, o

ventre pode variar entre o branco-amarelado e alaranjado. Possuem cauda atrofiada, pelagem densa e eriçada. São animais de pequeno porte, pesando de 500 a 880g, e fazem parte da dieta de carnívoros silvestres (GONÇALVES et al., 2014).



Figura 3- *Cavia aperea*

Fonte: <https://www.artigoscuriosos.com>

O habitat de *Cavia* spp. consiste de áreas de matas e formações arbustivas, sendo encontradas com frequência próximas a rodovias. A dieta é composta por grãos, frutas e folhas (ASHER et al., 2004).

3.1.4 *Galictis cuja* (Molina, 1782)

Galictis cuja (Mustelidae) (Figura 4), cujo nome popular é furão, tem uma pelagem peculiar onde a face, a região da garganta e os membros são escuros e o dorso é acinzentado com uma faixa branca que se estende da cabeça até a lateral do pescoço (GONÇALVES et al., 2014).

A espécie ocorre no sul do Peru, no oeste da Bolívia, no centro do Chile, Paraguai, Uruguai, Argentina e no leste ao sudeste do Brasil (YENSEN e TARIFA, 2003). Vivem em ambientes abertos e florestas, geralmente próximos a cursos d'água (POO-MUÑOZ et al., 2014). Alimentam-se de pequenos mamíferos, aves, répteis, anfíbios, insetos e frutos. São animais com hábitos diurnos, vivendo solitários ou em pequenos grupos (GONÇALVES et al., 2014).



Figura 4- *Galictis cuja*
Fonte: Marian Wigdorovitz

3.2 Protozoários Parasitos

3.2.1 *Babesia* e *Theileria*

Babesia spp. é um hemoprotozoário do filo Apicomplexa, com ampla distribuição geográfica que pode afetar animais silvestres, domésticos e até mesmo os seres humanos (CONRAD et al., 2006; GRAY & WEISS 2008; HERWALD et al. 2003; HUNFELD et al., 2008). É considerado o segundo protozoário mais comum encontrado no sangue de mamíferos (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; TELFORD et al., 1993). Com ciclo heteroxeno necessita de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado, para completar seu ciclo de vida (KAKOMA e MEHLHORN, 1994).

Babesia spp. tem como vetores os carrapatos *Boophilus annulatus* (América do Norte, Europa e Ásia), *B. geigy* (África), *B. microplus* (África, Austrália e América do Sul), além de *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus* responsáveis pela transmissão de *Babesia canis* (UILENBERG, 2006).

A babesiose humana é um problema de saúde crescente no nordeste dos Estados Unidos e tem como agente casual de infecção *Babesia microti* (Apicomplexa: Piroplasmida) transmitido através da picada do carrapato *Ixodes scapularis* (GRAY et al., 2010; HOMER et., 2000).

Theileria equi do filo Apicomplexa, que juntamente com *Babesia caballi* podem causar a piroplasmose equina. A piroplasmose recebeu este nome devido ao formato piriforme que ambos os parasitos apresentam quando estão infectando hemácias (JIMÉNEZ et al., 2021). Quando somente *T. equi* é o único parasito responsável pela infecção a doença é conhecida com teileriose.

Os vetores conhecidos de *T. equi* são os carrapatos ixodídeos, principalmente dos gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Hyalomma* (NOGUEIRA et al., 2017).

Em Procyonidae existem muitos relatos de Piroplamídeos em *Procyon lotor* Linnaeus, 1758 na América do Norte e Japão (TELFORD JR e FORRESTER, 1991; BIRKENHEUER et al., 2006; JINNAI et al., 2009). *Babesia* spp. são relatados com alta prevalência na população desses mamíferos (BIRKENHEUER et al., 2006; JINNAI et al., 2009).

Em um estudo molecular realizado no Sul dos Estados Unidos, Gray et al., (2010) detectaram *B. microti* em *P. lotor* (n=21) sendo que 18 estavam positivos para o protozoário. No Uruguai, Thompson et al. (2018) relataram *Babesia* sp. no sangue e diferentes tecidos (baço, fígado e músculo) de *P. cancrivorus* (n=13) com 5 positivos. No Brasil, não há relatos com diagnóstico de *Babesia* spp. nessa espécie de carnívoro.

Collere et al. (2021), em um estudo realizado no Brasil, com amostras de sangue de 18 *Nasua nasua* Linnaeus, 1766, testaram PCR de *Theileria/Babesia* spp. (18S rRNA), todas as amostras foram negativas. Silva et al. (2021) em um estudo molecular utilizando amostras de sangue e tecidos de mamíferos silvestres do Mato Grosso do Sul, relataram que as espécies a seguir foram negativas para *Theileria* e *Babesia* (*N. nasua* n=6, *P. cancrivorus* n=6)

No Brasil, Serra-Freire (1979) relatou *B. ernestoi* no sangue de *D. albiventris* (n=2). Wolf et al. (2016) realizaram um estudo molecular com *Babesia* e *Hepatozoon* no Pantanal, com 13 espécies de mamíferos silvestres, incluindo *D. albiventris*, o qual não apresentou positividade para os protozoários investigados.

Em um estudo realizado no Japão, com 247 roedores (*Apodemus speciosus*, *A. argenteus*, *Eothenomys andersoni*, *E. smithii*, *Microtus montebelli*, *Clethrionomys rufocanus* e *Urotrichus talpoides*), Saito-Ito et al.

(2007) relatam *Babesia microti* em 36 animais (24 em *A. speciosus*, 7 em *A. argenteus* e 5 em *E. andersoni*) por detecção de PCR, sendo que 27 destes 36 foram confirmados como positivos análises de esfregaços sanguíneos.

No Brasil, Criado-Fornelio et al. (2009) em análise molecular de amostras de sangue de *Hydrochaeris hydrochaeris* (n = 14) relataram duas positivas (prevalência de 14%) relacionando com *T. equi* (90% de semelhança do gene 18S RNA de acordo com a análise BLASTn).

Mustelidae possui relatos de *Babesia missirolii* em *Meles meles*, *B. mustelae* em *Mustela putorius* e *B. roubaudi* em *Ictonyx striatus* (KRIVKOVA, 1960; BIOCCA E CORRADETTI, 1952; LEBEDEFF E TSCHARNOTZKY, 1911; LEGER E BE´DIER, 1923).

3.2. 2 *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988

Neospora caninum do filo Apicomplexa é o agente etiológico da neosporose, uma doença infecciosa considerada uma das principais causas de perda reprodutiva em bovinos e doença neuromuscular em cães de todo o mundo (DONAHOE et al., 2015). Roedores e pequenos mamíferos são considerados possíveis fontes de infecção de *N. caninum* em cães e coiotes. (MCALLISTER, 2016).

Segundo relatos *N. caninum* tem uma ampla distribuição geográfica e uma variedade de hospedeiros tais como: canídeos, felinos, bovinos, equinos, suínos, roedores, coiotes entre outros (DUBEY et al., 2007; FERROGLIO et al., 2007; HUANG et al., 2004). Esses estudos são baseados em análises de exames de fezes, histopatológicos, imunológicos, sorológicos e detecção por métodos moleculares (DUBEY e SCHARES, 2006; DUBEY et al., 2007; DANAHOE et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; SINNOT et al., 2017).

No Brasil, Yai et al. (2008) verificaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em *H. hydrochaeris* (Caviidae: Rodentia) (n=213 soros) de 11 localidades do estado de São Paulo, pela RIFI, com anticorpos em 20 (9,4%) dos roedores. Enquanto que Valadas et al. (2010) relataram 3% de soropositividade para anticorpos de *N. caninum* (n=63). Truppel et al. (2010) relataram no estado do Pará, através da amplificação molecular da região Nc5

ou ITS1, 23% (6/26) de positividade para DNA de *N. caninum*, sendo que o protozoário foi encontrado nos gânglios linfáticos, coração, fígado e sangue.

Em Didelphidae *N. caninum* foi relatado em um estudo sorológico em *D. marsupialis* (n=396) de diferentes regiões da cidade de São Paulo, apresentando 21,2% (84/396) de positividade (YAI et al., 2003). Gondim et al., (2017) em um estudo molecular relataram nos tecidos (cérebro e baço) de *D. marsupialis* (n= 13) (81,2%) e *D. albiventris* (n=10) (43,5%). Na Louisiana, Houk et al., (2010) realizaram a sorologia de 30 amostras coletadas do hospedeiro *D. virginiana*, sendo que todas foram negativas para *N. caninum*.

Nos estudos realizados em Mustelidae na Grã-Bretanha, amostras de cérebro e de outros tecidos foram coletadas para análise molecular de 99 furões (*Mustela furo*), 70 doninhas europeias (*M. putorius*), 64 texugos eurásianos (*M. meles*) e 9 arminhos (*Mustela erminea*). Os resultados da PCR demonstraram que o DNA específico de *N. caninum* foi detectado em todas as espécies de carnívoros silvestres, com exceção dos arminhos (0/9), apresentando respectivamente, furões 10,1% (10/99), doninhas 18,6% (13/70), texugos 10,9% (7/64). Nos texugos, amostras positivas de DNA de *N. caninum* foram encontradas no cérebro (n= 2), fígado (n= 2) e músculo do pescoço (n= 3) (BARTLEY et al, 2012). Na Espanha, através de um estudo de sorologia Sobrino et al. (2008), relataram *N. caninum* em *M. meles* (n= 31, 6,4%) e em *M. putorius* (n=2, 50%). Em Portugal, foram analisadas amostras sorológicas de quatro espécies de mustelídeos: *M. meles*, *M. foina*, *Lutra lutra* e *M. putorius*, sendo que não foi confirmada positividade para esses hospedeiros (WAAP et al., 2017).

Em Procyonidae, *N. caninum* foi detectado através de análise de DNA do cérebro de *P. lotor* (n=1) nos Estados Unidos (LEMBERGER et al., 2005). Lindsay et al., (2001) relataram o protozoário através de testes de aglutinação em *P. lotor*.

4. Material e Métodos

4.1 Coleta dos hospedeiros

Foram coletados 72 mamíferos (50 *Didelphis albiventris*, 10 *Cavia aperea*, 4 *Galictis cuja* e 8 *Procyon cancrivorus*) em rodovias do Rio Grande do Sul, oriundos dos municípios de São Lourenço do Sul (Latitude: 31° 21' 46" Sul, Longitude: 51° 58' 44" Oeste), Capão do Leão (Latitude: -31.7675, Longitude: -52.4487 31° 46' 3" Sul, 52° 26' 55" Oeste) e Pelotas (Latitude: -31.776, Longitude: -52.3594 31° 46' 34" Sul, 52° 21' 34" Oeste) e Arroio Grande (Latitude: 32° 14' 19" Sul, Longitude: 53° 5' 27" Oeste, nos períodos entre janeiro de 2015 à abril de 2019, de acordo com licença concedida pelo ICMBio/SISBIO (nº 38913-5 e CEEA nº 8876), alguns desses animais foram doados pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS). Após serem levados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL) da Universidade Federal de Pelotas foram congelados a -20°C até o processamento. Durante a necropsia foi retirado o baço dos mamíferos para a extração de DNA.



Figura 5- *Didelphis albiventris* (necropsia)
Fonte: Scheer, Simone (2019)

4.2 Procedimentos para a Extração de DNA

Os tecidos coletados (baço) foram macerados e submetidos à digestão em solução de proteinase K (20mg/ml) e dodecil de sulfato de sódio 10% a

55°C por 2 horas. A extração e purificação do DNA genômico foi feita com o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e teve sua pureza conhecida através de espectrofotometria.

Durante o processo de extração foram utilizadas cepas de linhagens conhecidas como controles positivos e amostras com água e reagentes como controles negativos.

4.3 Reações de PCR

A amplificação por PCR dos fragmentos de DNA foi feita utilizando os primers e regiões alvo conforme Tabela 1.

As condições de amplificação para *Neospora caninum* consistiram de: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1min, 63° por 1min, 72°C por 1min, e uma extensão final a 72°C por 5min, seguido por um resfriamento a 4°C. *Babesia* e *Theileria* sp. tiveram um ciclo inicial de 95°C por 5min, seguido de 25 ciclos a 95°C por 3min, 50°C por 45s, 72 por 1,5min e 72°C por 10min, o nested PCR começou com um ciclo de 95°C por 5min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3min, 55°C por 45s, 72°C por 90s e 72°C por 10min.

Durante o processo de extração foram utilizadas cepas de linhagens conhecidas como controles positivos e água e como controle negativo.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (2%) corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Bio), em solução de TBE 0,5X (Tris-base 0,4M; ácido bórico 0,20M, solução de EDTA 0,5M, pH 8,0).

O marcador 100pb DNA Ladder (Promega Corporation) é utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos durante a eletroforese. Todos os géis foram observados e fotografados em um transluminador (L-Pix EXSystem-Loccus Biotecnologia).

Tabela 1- Regiões alvo e primers utilizados nas amplificações de DNA de *Babesia*, *Theileria* spp. e *Neospora caninum*

Região alvo	Protozoário	Primer		Referência
18S	<i>Babesia</i>	RLB-F2	5'-GACACAGGGAGGTTAGTGACAAG-3'	Gubbels et al., 1999.
		RLB-R2	5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'	
		RLB-FINT	5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3'	.
18S	<i>Neospora caninum</i>	NSP6PLUS	5'-CTGGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'	Romano et al., 2009
		NSP21PLUS	5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAA-3'	
18S	<i>Theileria</i>	RLB-F2	5'-GACACAGGGAGGTTAGTGACAAG-3'	Gubbels et al., 1999.
		RLB-R2	5'-GACACAGGGAGGTTAGTGACAAG-3'	
		RLB-R2	5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'	
		RLB-FINT	5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3'	

4.4 Purificação e sequenciamento

Os amplicons foram purificados utilizando o kit PCR Products Purification (Mebep Bioscience), quantificados e submetidos ao sequenciamento no Laboratório de Genômica Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

4.5 Análises das sequências

A identificação preliminar das sequências obtidas foi realizada por alinhamento com aquelas disponíveis na base de dados do GenBank, através de pesquisa por BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool- BLAST) (ZANG et al., 2000).

5. Manuscrito

5. 1 Manuscrito 1

Conforme as normas da revista Brazilian Journal of Development

**Ocorrência de *Theileria equi* e *Babesia* sp. (Piroplasmida) em *Didelphis albiventris*
Lund, 1840, no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Simone Scheer^{1*}

Mestra em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

sissi_sls@hotmail.com

Márcia Raquel Pegoraro Macedo²

Doutora em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

mrpmbio@gmail.com

Tatiele de Aguiar Lopes Soares³

Mestra em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

tatielelopess@hotmail.com

Gertrud Muller⁵

Doutora em Ciências Veterinárias

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

gertrud.muller40@gmail.com

Orcid author: <https://orcid.org/0000-0002-0179-0169>

Resumo: Babesiidae e Theileriidae são famílias com importantes protozoários transmitidos através de carrapatos que podem ocasionar doenças com potencial zoonótico. Os animais silvestres podem atuar como reservatórios para importantes zoonoses. O presente estudo teve como objetivo relatar através de PCR a ocorrência de *Theileria equi* e *Babesia* sp. em marsupiais no sul do Brasil. Foram coletadas amostras de tecidos do baço de 50 hospedeiros, sendo que seis (12%) foram positivas de acordo com a amplificação de PCR e com a análise por BLAST. Cinco foram positivas para *Theileria equi* e uma para *Babesia* sp. O estudo apresenta o primeiro registro de *Theileria equi* em *Didelphis albiventris* no Brasil.

Palavras-chave: PCR, *T. equi*, *Babesia* sp., *D. albiventris*.

Introdução

Piroplasmida são hemoparasitos de importância veterinária e médica que apresenta duas famílias principais: Babesiidae e Theileriidae (BARBOSA et al., 2017). *Babesia* spp. são protozoários que ocasionam uma doença de caráter zoonótico denominada babesiose. A babesiose é uma enfermidade emergente, transmitida por carrapatos ixodídeos, e os animais silvestres atuam como hospedeiros reservatórios para espécies de *Babesia* (YABSLEY e SHOCK, 2013). Os carrapatos transmitem os piroplasmas para os mamíferos através da picada, durante o repasto sanguíneo. Quando o hospedeiro vertebrado é infectado, esporozoítos de *Babesia* spp. vão diretamente para corrente sanguínea e infectam eritrócitos (ALVARADO-RYBAK et al., 2016).

Theileria infectam principalmente ruminantes e causam importantes perdas econômicas na agropecuária (BISHOP et al., 2004). Os esporozoítos penetram, primeiramente, nos linfócitos ou outros leucócitos e depois, migram para os eritrócitos (ALVARADO-RYBAK et al., 2016). Apenas duas espécies foram descritas em carnívoros silvestres, *Theileria parva* e *Theileria sinensis* (ALVARADO-RYBAK et al., 2016).

Didelphis albiventris Lund, 1840 (Didelphidae), é amplamente distribuído na América do Sul, se alimenta de pequenos invertebrados e vertebrados, frutas e sementes, e é considerado importante dispersor no meio ambiente (ÁVILA, 2012). De hábitos noturnos conseguem adaptar-se bem em ambientes silvestres, peri-urbanos e urbanos, abrigando-se nos forros das casas e até em terrenos abandonados (CACERES, 2000). Devido à destruição dos habitats naturais é possível observar a presença desses mamíferos próximos aos seres humanos, tornando essa espécie uma possível disseminadora de zoonoses (ANTUNES, 2005). Entre os parasitos já relatados para esse hospedeiro podemos citar: *Hepatozoon*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* (DA SILVA ET AL., 2017, NANTES ET AL., 2019 SANTIAGO ET AL., 2007, DUBEY et al., 2012).

Portanto, o objetivo deste estudo é relatar a ocorrência de *Theileria equi*, *Babesia* sp. em *D. albiventris* no sul do Rio Grande do Sul.

Material e Métodos:

Foram examinados 50 gambás (*D. albiventris*), dos quais seis oriundos do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS-UFPel), 31 atropelados em rodovias do Rio Grande do Sul, oriundos dos municípios de Capão do Leão (Latitude: -

31.7675, Longitude: -52.4487 31° 46' 3" Sul, 52° 26' 55" Oeste) e Pelotas (Latitude: -31.776, Longitude: -52.3594 31° 46' 34" Sul, 52° 21' 34" Oeste) entre os anos de 2006 e 2019, e treze atacados por cães em zonas urbanas da localidade do Capão do Leão e Pelotas. Os gambás atropelados foram coletados de acordo com licença concedida pelo ICMBio/SISBIO (nº 38913-5) CEEA/UFPel nº8876. Os marsupiais foram levados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL) da Universidade Federal de Pelotas, congelados a -20°C até o processamento. A coleta de tecidos (coração, fígado, baço, linfonodos, músculo, pulmões, rins e glândulas perianais) foi realizada durante a necropsia dos animais.

Para extração de DNA foi utilizado um fragmento de baço de cada espécime. O tecido foi macerado e submetido a lise em uma solução de Proteinase K (20mg/ml) a 55°C por 2 horas. A extração de DNA foi realizada com o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. Para controle de qualidade da extração de DNA, foram utilizadas cepas de linhagens conhecidas como controles positivos, e amostras com água e reagentes como controles negativos.

Para o diagnóstico de *Babesia* sp. e *Theileria* spp. foi realizada seminested PCR. Na primeira reação foram utilizados os primers RLB-F2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3') e RLB-R2 (5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3') (GUBBELS et al., 1999). A amplificação incluiu uma etapa de desnaturação de 5 min a 95°C seguida por 25 repetições de 30s a 95°C, 45 s a 50°C e 1,5 min a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 min. Para a segunda reação de PCR foi utilizado 1µl do produto de PCR da primeira reação e o primer interno RLB-FINT (5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3') juntamente com RLB-R2. A mistura de reação foi realizada em um volume final de 25µl, usando PCR Master Mix (Promega Corporation, WI, EUA), 10 mM de cada primer e 100 ng de DNA. Os programas de ciclagem foram idênticos à amplificação direta de RLB-F2 / RLB-R2, mas o número de ciclos aumentou para 40, enquanto a temperatura de anelamento foi de 50°C e 55°C na primeira e na segunda PCR, respectivamente. Controle positivo e negativo foram incluídos na reação.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2%) por coloração Blue Green Loading Dye I (LGC Bio), em solução de TBE 0,5X (Tris-base 0,4M; ácido bórico 0,20M, solução de EDTA 0,5M, pH 8,0). Foi

utilizado o marcador 100pb DNA Ladder (Promega Corporation) como referência para o tamanho dos fragmentos durante a eletroforese.

Os amplicons positivos foram purificados com o kit Products Purification Mebep Bioscience e submetidas a sequenciamento no Laboratório de Genômica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. As sequências resultantes foram comparadas com o banco de dados do Genbank usando a ferramenta BLAST (Local Alignment Search Tool), e o software Clustal X (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo>) foi usado para a construção de alinhamentos de múltiplas sequências.

Resultados e Discussão:

Dos 50 marsupiais analisados, seis (12%) foram positivos de acordo com a amplificação de PCR e com a análise por BLAST. Sendo que cinco foram positivos para *Theileria equi* e um para *Babesia* sp.

O alinhamento das sequências por BLAST, no Genbank, demonstrou homologias entre 99,21% e 100% com *Theileria equi* e *Babesia* sp. como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Códigos das sequências de *Theileria equi* e *Babesia* sp. obtidas de *Didelphis albiventris* (baço) e valores de homologia de acordo com o Blast no Genbank.

Hospedeiro	Homologia %	Espécies e gêneros que apresentaram homologia	Códigos no Genbank
Hosp 1	99,47 99,21	<i>Theileria equi</i>	OL638195.1 KX227623.1 MT4633608.1 Mt4633610.1 MT463607.1
Host 2	100	<i>Theileria equi</i>	MG052902.1 MF510479.1 KY952226.1 KX722520.1 KY464024.1 KX2276623.1 OL638195.1
Host 3	100	<i>Theileria equi</i>	MG052902.1 MF510479.1 KY952226.1

			KX722520.1 KY464024.1 KX227623.1 KX227629.1 OL638195.1
Host 4	99,73 96,76	<i>Babesia</i> sp. <i>Babesia</i> sp.	MG682489.1 MK580472.1 MK580471.1 AB251608.1
Host 5	100	<i>Theileria equi</i>	MG052902.1 MF510479.1 KY952226.1 KX722520.1 KY464024.1 KX227623.1 KX227629.1
Host 6	99,74	<i>Theileria equi</i>	MG052902.1 MF510479.1 KY952226.1 KX722520.1 KY464024.1

No Brasil, *D. albiventris* já foi descrito como reservatório de *Babesia* sp., (n= 67) sendo que 22 (16, 4%) foram positivos para o piroplasmídeo em análise sanguínea realizadas por PCR (GONÇALVES et al., 2021). Pode-se dizer que o estudo citado apresentou resultados semelhantes ao presente, exceto quanto ao tipo de amostra analisada. LOPES (2016) realizou uma análise de PCR utilizando o baço de 27 marsupiais, três foram positivos para *Babesia* sp. Através de análises por esfregaço sanguíneo, *Babesia ernestoi* foi relatada em *D. albiventris* (n=2) e *Didelphis marsupialis* (n=16). Em um estudo realizado no bioma da Amazônia, Soares et al., (2017) relataram por PCR *babesia* sp. em amostras de tecidos dos pulmões e fígado de *D. marsupialis* (n= 17, 1 positivado). DA SERRA (1979), em estudo experimental também relatou *B. ernestoi* em *D. albiventris*.

Colle et al., 2019, através de análise molecular realizado com *D. marsupialis* (n=31) oriundos do estado do Mato Grosso, detectaram *Hepatozoon* no sangue, fígado e baço e piroplasmoridas (*Babesia* sp. e *Theileria* sp.) no sangue (n=2 positivos). Os estudos relatados apresentaram resultados semelhantes ao realizado com *D. albiventris*,

porém é importante salientar que foram realizados com espécies diferentes do presente estudo. Os marsupiais são importantes reservatórios para uma diversidade de microorganismos, sendo muitas dessas espécies de caráter zoonótico (WOLF et al., 2016). São mamíferos que frequentemente podem ser encontrados aos redores de habitações urbanas e animais domésticos, por isso a importância em realizar esse tipo de análise.

O estudo apresentado relata o primeiro registro de *Theileria equi* que é transmitida através de carrapatos em marsupiais da família Didelphidae em *Didelphis albiventris* no Brasil.

Agradecimentos:

O trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação, por meio do Projeto “Diversidade Parasitária de Animais Silvestres no Rio Grande do Sul” nº32/2010.

Referências:

Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., Millán, J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and Vectors*, v. 9, p. 538, 2016.

Antunes, G.M. Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae). 2005. 122 f. Tese (Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ÁVILA, M.C.N. “Distribuição da família Didelphidae (Mammalia, Didelphimorphia) no Rio Grande do Sul, Brasil.” (2012).

Barbosa, A.; Reiss, A.; Jackson, B.; Warren, K.; Paparini, A.; Gillespie, G.; Stokeld, D.; Irwin, P.; Ryan, U. Prevalence, genetic diversity and potential clinical impact of blood-borne and enteric protozoan parasites in native mammals from northern Australia. *Vet Parasitol*, v.238, p.94–105, 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.007

Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., Nene, V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitol*, v. 129, p. 271-283, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182003004748>

Caceres, Nilton Carlos. Population ecology and reproduction of the white-eared opossum *Didelphis albiventris* (Mammalia, Marsupialia) in an urban environment of Brazil. *Ciência e Cultura* (São Paulo), v. 52, n. 3, p. 171-174, 2000.

Cantor, M., Ferreira, L. A., Silva, W. R., Setz, E. Z. F. Potential seed dispersal by *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) in highly disturbed environment. *Biota Neotrop*, v. 10, n. 2, p. 45-51, 2010.

Colle, A. C., Mendonça, R. F. B. D., Maia, M. O., Freitas, L. D. C., Witter, R., Marcili, A., Pacheco, R. D. C. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. *Ver Brasileira de Parasitol Vet*, 28, 592-604, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019086>

DA Serra Freire, N. M. *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, v. 26, n. 8, p. 614-622, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1979.tb00855.x>

Da Silva, M. R. L., Fornazari, F., de Castro Demoner, L., Teixeira, C. R., Langoni, H., & O'Dwyer, L. H. *Didelphis albiventris* naturally infected with Hepatozoon canis in southeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 6, p. 878-881, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>

Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., SU, C., Jones, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

Freire, Nicolau Maués da Serra. Contribuição ao conhecimento dos hemoparasitas de *Didelphis marsupialis* L., 1758 e *D. albiventris* Lund, 1841, no Brasil: *Babesia ernestoi* sp. n. (Piroplasmida: Babesiidae). 1976.

Gonçalves, L. R., Paludo, G., Bisol, T. B., Perles, L., DE Oliveira, L. B., DE OLIVEIRA, C. M., ANDRÉ, M. R. Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). *Parasitol research*, 120(10), 3537-3546, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07284-8>

Gubbels JM., De Vos AP., VAN DER W M., VISERAS J., Schouls LM., De Vries E., Jongejan F.: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6):1782 –1789. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1782-1789.1999>

Lopes, Marcos Gomes. **Epidemiological aspects of tick-borne diseases in wild and domestic animals of two environmental protection areas in the city of Natal, Rio Grande do Norte State, Brazil.** 2016. Tese de Doutorado: Universidade de São Paulo.

Nantes, W. A. G., Barreto, W. T. G., Santos, F. M., de Macedo, G. C., Ruco, A. C., de Oliveira Assis, W. & 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. *Int J for Parasitol: Parasites and Wildlife*, v. 9, p. 16-20, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.03.015>

Santiago, M. E. B., Vasconcelos, R. O., Fattori, K. R., Munari, D. P., de Fátima Michelin, A., & Lima, V. M. F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol*, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.026>.

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. *Int J for Parasitol: Parasites and Wildlife*, 6(2), 115-121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.05.002>

Yabsley, M. J., Shock, B. C. Natural history of Zoonotic Babesia: Role wildlife reservoirs. *Int J for Parasitol: Parasites and Wildlife*, v. 2, p. 18-31, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>.

Wolf, R. W., Aragona, M., Munoz-Leal, S., Pinto, L. B., Melo, A. L. T., Braga, I. A., 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 Dis*, v. 7, n. 3, p. 449-456, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.005>

6. Conclusões

Neospora caninum e *Babesia microti* apresentaram ocorrência em *Cavia aperea* e *Babesia* spp. em *Procyon cancrivorus*. Esses são os primeiros registros no Brasil, desses protozoários para esses hospedeiro (*C. aperea* e *P. cancrivorus*) através de estudos moleculares.

Registra-se pela primeira vez no Brasil, *Theileria equi* em *Didelphis albiventris* através de análise molecular do baço do hospedeiro.

Referências Bibliográficas

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V. A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 279-282, 1997.

ALLEN, K. E.; YABSLEY, M. J.; JOHNSON, E. M.; REICHARD, M. V.; PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; LITTLE, S. E. Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p.648-654, 2011.

ALMEIDA, A. P. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. 2011. Universidade de São Paulo.

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

ANDRÉ, M. R; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in Brazilian zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 1, p. 139-143, 2011.

ASHER, M.; DE OLIVEIRA, E. S.; SACHSER, N. Social system and spatial organization of wild guinea pigs (*Cavia aperea*) in a natural population. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 4, p. 788-796, 2004.

BARANDIKA, J. F.; ESPÍ, A.; OPORTO, B.; DEL CERRO, A.; BARRAL, M.; POVEDANO, I.; HURTADO, A. Occurrence and genetic diversity of piroplasms and other apicomplexa in wild carnivores. **Parasitology Open**, v. 2, 2016.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S. E.; ZIMMER, I. A.; ROY, S.; KITCHENER, A. C.; MEREDITH, A.; KATZER, F. Detection of *Neospora caninum* in wild carnivores in Great Britain. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 279-283, 2013.

BIOCCA, E.; CORRADETTI, A. *Babesia missirolli*, n. sp., parassita del tasso (*Meles meles*). **Riv Parassitol**, v. 13, p. 17, 1952.

BIRKENHEUER, A.J.; WHITTINGTON, J.; NEEL, J.; LARGE, E.; BARGER, A.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Molecular characterization of a *Babesia* species identified in a north American raccoon. **Journal Wildlife Dis.** 42, 375–380, 2006.

BURNS, R.; WILLIAMS, E. S.; O'TOOLE, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in captive black-footed ferrets (*Mustela nigripes*), 1992–1998: clinical signs, serology, pathology, and prevention. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 4, p. 787-797, 2003.

CÁCERES, N. C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 97-104, 2002.

CAÑON-FRANCO, W. A.; YAI, L. O.; JOBERT, A. M.; SOUZA, C. E.; D'AURIA, S. N.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 850-850, 2003.

COLLERE, F. C., DELAI, R. M., FERRARI, L. D., DA SILVA, L. H., FOGAÇA, P. L., RODRIGUES, A. N., ... & VIEIRA, R. F. 'Candidatus Mycoplasma haematonasua' and tick-borne pathogens in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1976) from the Iguaçu National Park, Paraná State, southern Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 3222-3229, 2021.

CONRAD, P.A.; KJEMTRUP, A.M.; CARRENO, R.A.; THOFORD, J., WAINWRIGHT, K.; EBERHARD, M.; QUICK, R.; TELFORD III, S.R.; HERWALDT, B.L. Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. **International Journal Parasitology**. 36, 779–789, 2006.

CHEREM, J. J.; KAMMERS, M.; GHIZONI-JR., I. R.; MARTINS, A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Biotemas**, v. 20, n.2, p. 81-96. 2007.

CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A., CASADO, N.; GIMENEZ, C.; RUAS, J., WENDT, L.; BARBA-CARRETERO, J. Molecular characterization of arthropod-

borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 3, p. 187-193, 2009.

DA SERRA FREIRE, N. M. *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 26, n. 8, p. 614-622, 1979.

DA SILVA, M. R. L.; FORNAZARI, F.; DE CASTRO, D. L.; TEIXEIRA, C. R., LANGONI, H.; O'DWYER, L. H. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. **Ticks and tick-borne Diseases**, v. 8, n. 6, p. 878-881, 2017.

DA SILVA, M. R. L.; FORNAZARI, F.; MARTINS, T. F.; HIPPIÓLITO, A. G.; ROLIM, L. S.; BISCA, J. M.; O'DWYER, L. H. A survey of hemoparasites and ectoparasites in *Nasua nasua* Linnaeus, 1766 with a redescription of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 based on morphological and molecular data. **Parasitology Research**, v. 117, n. 7, p. 2159-2169, 2018.

DE AZEVEDO, G. L.; MORAES, P. H. G.; DO NASCIMENTO, L. D. C. S.; O'DWYER, L. H.; NUNES, M. R. T.; ROSSI, A. D. R. P.; GONÇALVES, E. C. Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061-1066, 2016.

DE AZEVEDO, G. L.; MORAES, L. A.; AGUIAR, D. C. F.; DIAS, H. L. T.; RIBEIRO, A. S. S.; DO COUTO ROCHA, H. P.; GONÇALVES, E. C. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu* from eastern Amazon. **Ticks and tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 314-318, 2018.

DE SOUSA, K. C. M.; FERNANDES, M. P.; HERRERA, H. M.; BENEVENUTE, J. L.; SANTOS, F. M.; ROCHA, F. L.; DE ANDRADE PINTO, P. C. E. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 237, p. 37-46, 2017.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

DUARTE, J. Artiodactyla–Cervidae (veado-catingueiro, veado-campeiro, cervo-do-pantanal). **Cubas, ZS; Silva, JCR & Catão-Dias, JL Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. Editora Roca. 1354p**, p. 641-664, 2007.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

FERNANDAS, O.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; CAMPBELL, D. A. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 97-99, 2001.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K. R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 1-7, 2005.

FORNAZARI, F.; TEIXEIRA, C. R.; DA SILVA, R. C.; LEIVA, M.; DE ALMEIDA, S. C.; LANGONI, H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 238-241, 2011.

GATTI, A.; BIANCHI, R.; ROSA, C. R. X.; MENDES, S. L. Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 22, n. 2, p. 227-230, 2006.

GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, Á.; DE MIGUEL, F. Á.; DOMINGUEZ-PENAFIEL, G. A molecular survey of Piroplasmida and *Hepatozoon* isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 147-150, 2009.

GJERDE, B.; JOSEFSEN, T. D. Molecular characterisation of *Sarcocystis lutrae* n. sp. and *Toxoplasma gondii* from the musculature of two *Eurasian otters* (*Lutra lutra*) in Norway. **Parasitology Research**, v. 114, n. 3, p. 873-886, 2015.

GONÇALVES, Gislene Lopes; QUINTELA, Fernando Marques; DE FREITAS, Thales Renato Ochotorena (Ed.). **Mamíferos do Rio Grande do Sul**. ONG Mamíferos RS, 2014.

GONDIM, L. S.; JESUS, R. F.; RIBEIRO-ANDRADE, M., SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; MARVULO, M. F.; SOARES, R. M. *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* in Brazilian opossums (*Didelphis* spp.): Molecular investigation and in vitro isolation of *Sarcocystis* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 192-198, 2017.

GRAY, J.S.; WEISS, L.M. *Babesia microti*. In: Khan, N. (Ed.), *Emerging Protozoan Pathogens*. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp. 303–349, 2008.

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

GUBBELS, J.M; DE VOS, A.P, VAN DER WEIDE .M; VISERAS .J, SCHOULS L.M, DE VRIES. E, JONGEJAN. F: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p.1782 –1789, 1999.

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

HERWALDT, B.L.; CACCIÒ, S.; GHERLINZONI, F.; ASPÖCK, H.; SLEMENDA, S.B.; PICCALUGA, P. Molecular characterization of a non-*Babesia* divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 942–948, 2003.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M., VAN K, F. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 83, p. 285–289, 1997.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology**, v. 13, n.3, p. 451-69, 2000.

HOUK, A. E.; GOODWIN, D. G.; ZAJAC, A. M.; BARR, S. C.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, *Besnoitia darlingi*, and *Neospora caninum* in North American opossums, *Didelphis virginiana*, from southern Louisiana. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1119-1123, 2010.

HUNFELD, K. P.; HILDEBRAND, A.; GRAY, J. S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219-1237, 2008.

HŮRKOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 150-154, 2006.

JINNAI, M.; KAWABUCHI-KURATA, K.; TSUJI, M.; NAKAJIMA, R.; FUJISAWA, K.; NAGATA, S.; KOIDE, H.; MATOBA, Y.; ASAKAWA, M.; TAKAHASHI, K.; ISHIHARA, C. Molecular evidence for the presence of new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido. Jpn. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 241–247, 2009.

JIMÉNEZ, I. M. G.; CASTRO, F. F. C.; ALONSO, F. J. A.; CALDERÓN, L. G. R. Utilización de PCR para la identificación de Piroplasmosis equina en un criadero de Jamundí (Colombia). **RIAA**, v. 12, n. 1, p. 2, 2021.

KAKOMA, I., MEHLHORN, M. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier, J.P. (Ed.), **Parasitic Protozoa**, v. 7. Academic Press, San Diego, pp. 141–216. 1994.

KUBO, M.; NAGATAKI, M.; AGATSUMA, T.; SAKAI, H.; MASEGI, T.; PANCIERA, R. J.; YANAI, T. Parasitological and molecular features of the *Hepatozoon* species in the myocardium of Japanese Martens (*Martes melampus melampus*). **The Journal of Parasitology**, p. 1496-1502, 2009.

LEBEDEFF, W.; TSCHARNOTZKY, A. Ein neuer Parasit im Blute des Iltis, *Microsoma mustelae*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: **Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie**, v. 58, p. 625-631, 1911.

LEMBERGER, K. Y.; GONDIM, L. P.; PESSIER, A. P.; MCALLISTER, M. M.; KINSEL, M. J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 960-962, 2005.

LEGER, M.; BÉDIER, E. *Plasmodium* d'un mustélide, *Ictonyx zorilla*, du Senegal. C. R. Hebd. Séanc. **Compte rendu des seances de la Societe de Biologie**, v. 88, p. 422–424, 1923.

LINDSAY, D. S.; SPENCER, J.; RUPPRECHT, C.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1197-1199, 2001.

LOPES, A. P.; SARGO, R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals from Portugal. **Parasitology Research**, v. 108, n. 5, p. 1163-1169, 2011.

MAJLÁTHOVÁ, V.; HURNÍKOVÁ, Z.; MAJLÁTH, I.; PEŤKO, B. *Hepatozoon canis* infection in Slovakia: imported or autochthonous?. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 199-202, 2007.

MATHEW, J. S., VAN DEN BUSSCHE, R. A., EWING, S. A., MALAYER, J. R., LATHA, B. R., PANCIERA, R. J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **The Journal of Parasitology**, p. 366-372, 2000.

MATJILA, P. T.; LEISEWITZ, A. L.; JONGEJAN, F.; BERTSCHINGER, H. J.; PENZHORN, B. L. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 123-127, 2008.

MENESES, A.; ALVARADO, G.; RUNNEBAUM, M.; HERRERA, M.; GUTIÉRREZ-ESPELETA, G.; CHAVES, A. Primer reporte de *Hepatozoon procyonis* en Mapaches de Costa Rica. **Ciências Veterinárias**, v. 34, n. 1, p. 51-54, 2016.

METZGER, B. *Hepatozoon* spp. em carnívoros neotropicais presentes em vida livre no Parque Nacional das Emas, em Goiás, Brasil, 2013.

MC ALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

NASCIMENTO, C. O. M.; SILVA, M. L. C. R.; KIM, P. C. P.; GOMES, A. A. B.; GOMES, A. L. V., MAIA, R. C. C.; MOTA, R. A. Occurrence of *Neospora*

caninum and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. **Acta Tropica**, v. 146, p. 60-65, 2015.

NOGUEIRA, R. D. M. S.; SILVA, A. B.; SATO, T. P.; SÁ, J. C. D.; SANTOS, A. C. G. D., AMORIM, E. F.; GAZÊTA, G. S. Detecção molecular e serológica de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* em equinos e carrapatos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1416-1422, 2017.

O DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y.; KOHAYAGAWA, A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 688-690, 2006.

OROZCO, Natalia Lopez. **Detecção molecular de parasitos da família Sarcocystidae em amostras teciduais de roedores silvestres (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) depositadas em museus do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, G. A.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.; CHIARELLO, A. G.; MENDES, S. L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. **Occasional papers in Conservation Biology**, 2012.

PARK, S.; CHOI, U. S.; KIM, E. J.; LEE, J. H.; LEE, H. B.; CHO, H. S.; KIM, B. Coinfection with *Hepatozoon* sp. and Canine Distemper Virus in a Yellow-throated Marten (*Martes flavigula koreana*) in Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 414-417, 2016.

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F.; VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M.; EVÊNCIO NETO, J. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 1009-1014, 2009.

POO-MUÑOZ, D. A.; ESCOBAR, L. E.; PETERSON, A. T.; ASTORGA, F.; ORGAN, J. F.; MEDINA-VOGEL, G. *Galictis cuja* (Mammalia): an update of current knowledge and geographic distribution. **Iheringia Série Zoologia**, v. 104, n. 3, p. 341-346, 2014.

REID, F.; HELGEN, K. *Procyon cancrivorus*. In: IUCN 2010. IUCN red list of threatened species, 2008.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; SILVA, R. C. D.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 602-607, 2016.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; MASSARD, C. L. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 347-350, 2007.

ROMANO, A.; TRISCIUOGGIO, A.; GRANDE, D.; FERROGLIO, E. Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 159–161, 2009.

SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 223-231, 2006.

SEPÚLVEDA, M. A.; MUNOZ-ZANZI, C.; ROSENFELD, C.; JARA, R.; PELICAN, K. M.; HILL, D. *Toxoplasma gondii* in feral American minks at the Maullin river, Chile. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 60-65, 2011.

SINNOTT, F. A.; MONTE, L. G.; COLLARES, T. F.; SILVEIRA, R. M.; BORSUK, S. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 19-25, 2017.

SILVA, J.C.R. Toxoplasmose. In: Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. (Eds.), **Tratado de Animais Selvagens**, 2006, pp. 768–784, São Paulo, Brazil.

SILVA, A.V.; BOSCO, S.M.G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian wild mammals: serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.81–83, 2006.

SILVA, V. L. D. B.; ALMEIDA, S. L. H. D.; MAIA, M. O.; SANTOS, T. Á.; PAVELEGINI, L. A. D.; ZAFFALON, G. B.; PACHECO, R. D. C. Detecção post mortem de hemoparasitas protozoários em mamíferos selvagens do estado de

Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021.

SOBRINO, R.; CABEZÓN, O.; MILLÁN, J.; PABÓN, M.; ARNAL, M. C.; LUCO, D. F.; ALMERIA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 187-192, 2007.

SOBRINO, R.; DUBEY, J. P.; PABÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O. C.; MILLÁN, J.; GORTÁZAR, C. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 190-197, 2008.

SOGORB, F.; JAMRA, L.F., GUIMARÃES, F.C., 1977. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 191–194.

SPOLIDORIO, M. G. **Perfil sorológico e molecular de zoonoses transmitidas por carrapatos em humanos e animais domésticos oriundos de seis municípios do Estado do Espírito Santo**. 2009. Universidade de São Paulo.

SUZÁN, G.; CEBALLOS, G. The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico City limits. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 3, p. 479-485, 2005.

TELFORD Jr., S.R., FORRESTER, D.J. Hemoparasites of raccoons (*Procyon lotor*) in Florida. **Journal Wildlife Diseases**, v. 27, p. 486–490, 1991.

TELFORD, S.R.; GORENFLOT, A.; BRASSEUR, P.; SPIELMAN, A. Babesial infection in human and wildlife. In: Kreier, J.P., Baker, J.R. (Eds.), *Parasitic Protozoa*, vol. 5, 7. **Academic Press**, San Diego, pp. 1–47, 1993.

TOCIDLOWSKI, M. E.; LAPPIN, M. R.; SUMNER, P. W.; STOSKOPF, M. K. Serologic survey for toxoplasmosis in river otters. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 3, p. 649-652, 1997.

THOISY, B.; DEMAR, M.; AZNAR, C.; CARME, B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. **Journal Wildlife Diseases**, v. 39, p. 456–459, 2003.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.24 p.4876–4882, 1997.

THOMPSON, C. S.; MANGOLD, A. J.; FÉLIX, M. L.; CARVALHO, L.; ARMÚA-FERNÁNDEZ, M. T.; VENZAL, J. M. Molecular evidence of *Babesia* species in *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in Uruguay. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 230-233, 2018.

TRUPPEL, J. H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; DE CASTRO, R. G. D. O.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; THOMAZ-SOCCOL, V. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International**, v. 59, n. 3, p. 376-379, 2010a.

TRUPPEL, J. H.; REIFUR, L.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; DE CASTRO, R. G. D. O.; GENNARI, S. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 141-146, 2010b.

UILENBERG, Gerrit. *Babesia*—a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

VALADAS, S.; GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 521-524, 2010.

ZANET, S., PALESE, V., TRISCIUOGGIO, A., ALONSO, C. C., FERROGLIO, E. *Encephalitozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in invasive Eastern Cottontail Rabbits *Sylvilagus floridanus* in Northwestern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 682-684, 2013.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W.A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

YANAI, T.; TOMITA, A.; MASEGI, T.; ISHIKAWA, K.; IWASAKI, T.; YAMAZOE, K.; UEDA, K. Histopathologic features of naturally occurring hepatozoonosis in wild martens (*Martes melampus*) in Japan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 233-237, 1995.

YAI L.O.; CAÑON-FRANCO W. A.; GERALDI V.C.; SUMMA M.E.L.; CAMARGO MCGO, DUBEY J.P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal Parasitology**, v. 89, n4, p.870-871, 2003.

YAI, L. Caracterização biológica e genotípica de isolados de *T. gondii* de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) do Estado de São Paulo. São Paulo 2007. 137p. (**Doutorado em Epidemiologia e Experimental e Aplicada às Zoonoses**), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2007.

YAI, L. O., RAGOZO, A. A., CAÑÓN-FRANCO, W. A., DUBEY, J. P., GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 766-767, 2008.

YENSEN, E.; TARIFA, T. *Galictis cuja*. **Mammalian Species**, v. 2003, n. 728, p. 1-8, 2003.

WAAP, H.; NUNES, T.; VAZ, Y.; LEITÃO, A. Serological study of *Neospora caninum* in dogs and wildlife in a nature conservation area in southern Portugal. **Parasitology Open**, v. 3, 2017.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; LABRUNA, M. B. 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, n. 3, p. 449-456, 2016.

Apêndice

Conforme as normas da revista Brazilian Journal of Development

Molecular Analysis on Protozoa in Wild Mammals Run Over in Southern
Rio Grande do Sul, Brazil

Análise Molecular de Protozoários em Mamíferos Silvestres atropelados no
Sul do Rio Grande do Sul

Simone Scheer^{1*}

Mestra em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

sissi_sls@hotmail.com

Márcia Raquel Pegoraro Macedo²

Doutora em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

mrpmbio@gmail.com

Tatiele de Aguiar Lopes Soares³

Mestra em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

tatielelopes@hotmail.com

Alice Graciela Suarez⁴

Doutora em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

mendes_graciela@hotmail.com

Gertrud Muller⁵

Doutora em Ciências Veterinárias

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário
Capão do Leão, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

gertrud.muller40@gmail.com

Abstract

The phylum Apicomplexa is divided into four main groups, which include important genera such as *Babesia*, *Theileria* and *Neospora*, which are responsible for diseases that can affect domestic and wild animals. The objective of this study was to ascertain occurrences of *Neospora caninum*, *Babesia* sp., *Babesia microti*, *Piroplasmida* sp. and *Theileria equi* in wild mammals in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty-two wild mammals that were found dead as roadkill in this region were necropsied, and organ fragments were collected. The spleen was used for DNA extraction and for parasite detection via PCR. Studies carried out through molecular analysis contribute towards identifying the elements that cause new cases of disease and the emergence of potential reservoirs and vectors. Thus, through these molecular studies, the following were recorded for the first time in Brazil: *Neospora caninum* and *Babesia microti* in *Cavia aperea*, *Babesia* sp., *Theileria equi* and *Piroplasmida* sp. in *Procyon cancrivorus*; and *T. equi* in *Galictis cuja*.

Key words: wild mammals; *Neospora caninum*; *Babesia microti*; *Babesia* sp.; *Theileria equi*; *Piroplasmida* sp.

Introduction

The phylum Apicomplexa is divided into four main groups: Coccidia (coccids), Gregarinasina (gregarines), Haemospororida (haemosporidians) and Pyroplasmorida (piroplasmids) (ADL et al., 2012). Pyroplasmorida encompasses two important genera, *Babesia* and *Theileria*, with wide geographical distribution, which are responsible for diseases that can affect domestic and wild animals and also cause numerous economic losses (CONRAD et al., 2006; GRAY & WEISS, 2008; HERWALD et al., 2003; UILENBERG, 2006).

Babesia spp. is considered to be the second most common protozoon found in mammalian blood (KAKOMA & MEHLHORN, 1994; TELFORD et al., 1993). It has a heteroxenic cycle, i.e. it needs both a vertebrate host and an invertebrate host to complete its life cycle. *Theileria* spp. is transmitted by ixodid ticks of the genera *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus*.

Neospora caninum Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988 (Coccidia) has wide geographical distribution and a variety of hosts, such as dogs, cats, cattle, horses, pigs, rodents and coyotes, among others (DUBEY et al., 2007; FERROGLIO et al., 2007; HUANG et al., 2004). It has great importance in veterinary healthcare, given that it can cause neosporosis, which can lead to spontaneous abortion in cattle rearing (DUBEY et al., 2007).

Wildlife hit-and-run accidents are the second largest cause of biodiversity loss, only behind the reduction of natural environments (CHEREM et al., 2007). According to the National Department of Highways/Military Institute of Engineering (DNER/IME, 2001), 475 million animals are run over per year in Brazil. These animals form a source of data for diagnostic, epidemiological, dietary and parasitic fauna studies.

Therefore, the objective of the present study was to ascertain occurrences of *Neospora caninum*, *Babesia* sp., *Babesia microti*, *Piroplasmida* sp. and *Theileria equi* in wild mammals that were run over in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Materials and methods

Twenty-two wild mammals that had been run over on highways in Rio Grande do Sul were collected (10 specimens of *Cavia aperea*, 8 of *Procyon cancrivorus* and 4 of *Galictis cuja*), in accordance with a license granted by ICMBio/SISBIO (no. 38913-5). These specimens were found in the municipalities of Capão do Leão (31° 46' 3" South; 52° 26' 55" West), Pelotas (31° 46' 34" South; 52° 21' 34" West) and Arroio Grande (32° 14' 19" South; 53° 5' 27" West). The carcasses were taken to the Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL) of the Universidade Federal de Pelotas, where they were frozen at -20 °C until processing. Tissue collection was performed during the necropsies on the animals.

For DNA extraction, the mammalian spleen was macerated and placed in tubes with a proteinase K solution (20 mg/ml) for digestion in a water bath at 55 °C for 2 hours. DNA extraction was performed using the Invisorb® spin tissue kit, following the manufacturer's instructions. The DNA was quantified and its purity was ascertained through spectrophotometry. For quality control of DNA extraction, strains of known lineages were used as positive controls and samples consisting of water and reagents were used as negative controls.

To diagnose *Neospora caninum* through PCR, the primers used were NSP6PLUS (5'-CTGGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') and NSP21PLUS (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAA-3') (Romano et al., 2009), for the 18S DNA region. The amplification conditions consisted of an initial cycle of denaturation at 95 °C for 5 min; followed by 40 cycles at 95 °C for 1 min, 63 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 5 min, followed by cooling to 4 °C.

To diagnose *Babesia* spp., *Piroplasmida* sp. and *Theileria* spp., semi-nested PCR was performed. In the first reaction, the primers RLB-F2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGTGACAAG-3') and RLB-R2 (5'-CTAAGAATTTACCTGACAGT-3') (GUBBELS et al., 1999) were used. The amplification included a denaturation step of 5 min at 95 °C; followed by 25 repetitions of 30 s at 95 °C, 45 s at 50 °C and 1.5 min at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 10 min. For the second PCR reaction, 1 µl of the PCR product from the first reaction and the internal primer RLB-FINT (5'-GACAAGAAATAACACRGGC-3') together with RLB-R2 were used. The reaction mixture was performed in a final volume of 25 µl, using Promega PCR Master Mix (Promega Corporation, WI, USA), 20 pM of each primer and 100 ng of DNA. The cycling programs were identical to the direct

amplification of RLB-F2 / RLB-R2, but the number of cycles increased to 40, while the annealing, temperature was 50 °C and 55 °C in the first and second PCR, respectively. Positive and negative control samples were included in the reaction.

The amplification products were analyzed by means of electrophoresis on agarose gel (2%) with blue green loading dye I (LGC Bio) staining, in 0.5X TBE solution (0.4 M tris-base, 0.20 M boric acid and 0.5 M EDTA solution; pH 8.0). The products were viewed using a transilluminator.

The positive amplicons were purified using the Mebep Bioscience product purification kit and were subjected to sequencing at the Genome Laboratory of the Biotechnology Center of the Federal University of Pelotas. The resulting sequences were compared with records in the GenBank database using the BLAST local alignment search tool. The Clustal X software (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo>) was used to build multiple sequence alignments.

Results

Among the total of 22 mammal specimens that were analyzed, at least one specimen in each group was positive for one genus of each of the protozoa studied, as shown in Table 1.

Table 1 - Prevalence of *Neospora caninum*, *Babesia* sp., *Babesia microti*, *Piroplasmida* sp. and *Theileria equi* in the spleen of mammals that were run over in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Hosts	N° de Hosts positives				Prevalence
	Protozoa				
	<i>Neospora</i>	<i>Babesia</i>	<i>Piroplasmida</i> sp.	<i>Theileria equi</i>	
<i>Cavia aperea</i> Erxleben, 1777	1	1	Negatives	Negatives	20%
<i>Procyon cancrivorus</i> (Cuvier, 1798)	Negatives	3	3	1	87,50%
<i>Galictis cuja</i> (Molina, 1782)	Negatives	Negatives	Negatives	1	25%

Neospora caninum in *C. aperea*, presented 100% similarity with four sequences (GU300774.1; KX683873.1; KF649848.1; MG973172.1) that were obtained through the BLAST search. *Babesia microti* in *C. aperea* presented 93.26% similarity with two sequences (AB242176.1; AB190287.1).

Theileria equi in *G. cuja* was found to present 100% similarity with seven sequences (MG052902.1; MF510479.1; KY952226.1; KX722520.1; KY464024.1; KX227629.1; KX227623.1).

In *P. cancrivorus*, *Piroplasmida* sp. presented the following percentage similarities with GenBank sequences: 98.12% with EF057099.1, 98.17% with EF057099.1 and 97.72% with EF057099.1. *Babesia* sp. presented 99.66% with MG682489.1, 99.74% with MG682489.1 and 100% with MG682492.1. *Theileria equi* presented 99.76% similarity with seven sequences (MG052902.1; MF510479.1; KY952226.1; KX722520.1; KY464024.1; KX227629.1; KX227623.1).

Discussion

Neospora caninum has a life cycle involving canids as definitive hosts, namely, the domestic dog and Australian dingo (*Canis familiaris*), grey wolf (*Canis lupus*) and coyote (*Canis latrans*), and many other species as intermediate hosts (MCALLISTER et al., 1998; BASSO et al., 2001; DUBEY et al., 2011). Through seroprevalence studies, presence of *N. caninum* has been reported in several countries and in groups of wild animals such as dogs, cats, mustelids, deer and birds (DUBEY et al., 2008; SOBRINO et al., 2008; MILLÁN et al., 2009; STIEVE et al., 2010).

In Brazil, Yai et al. (2008) investigated the presence of anti-*N. caninum* antibodies in *Hydrochoerus hydrochaeris* (Caviidae: Rodentia) (n = 213 serum samples) from 11 locations in the state of São Paulo, by means of the indirect immunofluorescence reaction (IIFR), and found antibodies in 20 (9.4%) of these rodents. In the state of Pará, Truppel et al. (2010) found through molecular amplification of the Nc5 or ITS1 region that 23% (6/26) of their samples were positive for *N. caninum* DNA. This protozoon was found in the lymphatic glands, heart, liver and blood in *H. hydrochaeris*.

Although the present study reported the presence of *N. caninum* in another host and in other tissues, there were similarities in the occurrence data relating to this protozoon (Table 1). It is important to emphasize that this is the first report of *N. caninum* in *C. aperea*. Dubey et al. (2014) reported on occurrence of *N. caninum* in the brain of *C. lupus* (n = 2) in the United States, through a molecular study. Through the BLAST search, it can be concluded that presented 100% similarity with the present study.

In Brazil, through molecular studies, Braga et al. (2017) recorded occurrences of *T. equi* in donkeys, horses and mules on São Luís Island, state of Maranhão, in 2/10 (20%), 15/39 (38.5%) and 13/90 (14.4%), respectively. Although their study was conducted on a group of hosts that differed from those of the present study, similarities

can be observed regarding the prevalence data obtained (Table 1). Through the BLAST search, 100% similarity with the sequences obtained was ascertained. With regard to wild animals, especially *G. cuja* and *P. cancrivorus*, the present report provides the first record through molecular analysis on tissues.

In a study conducted in Japan on 247 rodents (162 specimens of *Apodemus speciosus*: Muridae; 63 of *Apodemus argenteus*; 11 of *Eothenomys andersoni*: Cricetidae; 3 of *Eothenomys smithii*; 4 of *Microtus montebelli*: Cricetidae; 3 of *Clethrionomys rufocanus*: Cricetidae; and 1 of *Urotrichus talpoides*: Talpidae), Saito-Ito et al. (2007) reported that *Babesia microti* was present in 36 rodents (24 *A. speciosus*, 7 *A. argenteus* and 5 *E. andersoni*), through PCR detection. Among these 36 rodents, 27 were confirmed as positive through blood smears. Their report presents 93.26% similarity with the sequences of the present study. It is important to note that *B. microti* is the infectious agent responsible for human babesiosis, which is a growing health problem in the northeastern United States, transmitted through the bite of the tick *Ixodes scapularis* (GRAY et al., 2010; HOMER et al., 2000). The United States is a country where introduction of wild animals as pets is a very common act among the population (SOUZA, 2011).

There are many reports of on piroplasmids in *Procyon lotor* Linnaeus, 1758 (Procyonidae: Carnivora) in North America and Japan (TELFORD JR. & FORRESTER, 1991; BIRKENHEUER et al., 2006; JINNAI et al., 2009). It has been reported that *Babesia* spp. has high prevalence in the population of this mammal. In Uruguay, Thompson et al. (2018) reported finding *Babesia* sp. in blood and different tissues (spleen, liver and muscle) in 5 specimens of *P. cancrivorus* (n = 13). Corroborating their study, there are similarities in the present study regarding prevalence data (Table 1). The isolate of *P. cancrivorus* had 100% similarity with the sequences obtained through the BLAST analysis. In Brazil, no reports have diagnosed *Babesia* spp. in this species of carnivore.

Conclusion

Wild animals act as important hosts for a diversity of microorganisms. Studies carried out through molecular analysis contribute towards identifying the elements that cause new cases of disease and the emergence of potential reservoirs and vectors.

Through the molecular analyses carried out here, it was possible to record the following for the first time in Brazil: *Neospora caninum* and *Babesia microti* in *Cavia aperea*; *Babesia* sp., *Theileria equi* and *Piroplasmida* sp. in *Procyon cancrivorus*; and *T. equi* in *Galictis cuja*.

Acknowledgements

The work was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação, through the Project “Parasite Diversity of Wild Animals in the Rio Grande do Sul” n°32/2010.

Financial support

This research was supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) funds through scholarship (1741163) for SS.

References

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS. The revised classification of eukaryotes J. Eukaryot. Microbiol, 59 (2012), pp. 429-493.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol* 2001; 87: 612–618.
- Birkenheuer, AJ, Whittington J, Neel J, Large E, Barger A, Levy MG, Breitschwerdt EB. Molecular characterization of a *Babesia* species identified in a north American raccoon. *J. Wildl* 2006; 42: 375–380.
- Braga M D SCD, Costa, F N, Gomes, DR M, Xavier DR, André M R, Gonçalves L R, Machado RZ. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vete* 2017; 26(3), 331-339.

Conrad, PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thoford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford Iii SR, Herwaldt BL. Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. *Int J Parasitol* 2006; 36: 779–789.

Cherem JJ, Kammers M, Ghizoni JRIR, Martins A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas* 2007; 20 (2): 81-6.

Dubey, JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol* 2007; 20: 323–367.

Dubey JP, Mansfield K, Hall B, Kwok OCH, Thulliez P. 2008. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in black tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) and mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). *Vet Parasitol* 2008; 156: 310–313.

Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Choudhary S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2011; 181: 382–387.

Dubey JP, Jenkins MC, Ferreira LR, Choudhary S, Verma SK, Kwok OCH, Carstensen M. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Vet parasitol* 2014;201(1-2):150-153, 2014.

Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuglio A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol* 2007; 148(3-4): 346-349.

Gray JS, Weiss LM. *Babesia microti*. In: Khan, N. (Ed.), Emerging Protozoan Pathogens. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp. 303–349, 2008.

Gray J, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld K-P, Weiss L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis* 2010;1:3–10.

Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6):1782 –1789.

Herwaldt BL, Cacciò S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect Dis* 2003; 9: 942–948.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, Krause PJ, Persing DH *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul; 13(3):451-69.

Hunfeld KP, Brade V. Zoonotic *Babesia*: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *Int J Med Microbiol Sup* 2004; 293: 93-103.

Kakoma I, Mehlhorn M. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. 7. Academic Press, San Diego, pp. 141–216. 1994.

Jinnai M, Kawabuchi-Kurata K, Tsuji M, Nakajima R, Fujisawa K, Nagata S, Koide H, Matoba Y, Asakawa M, Takahashi K, Ishihara C. Molecular evidence for the presence of new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido. *Jpn. Vet. Parasitol* 2009; 162: 241–247.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley, WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1473–1478.

Millán J, Cabezón O, Pabón M, Dubey JP, Almería S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet Parasitol* 2009; 165: 323–326.

Romano A, Trisciuglio A, Grande D, Ferroglio E. Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. *Vet Parasitol* 2009;159: 159–161.

Saito-Ito A, Kasahara M, Kasai M, Dantrakool A, Kawai A, Fujita H, Takada N. Survey of *Babesia microti* Infection in Field Rodents in Japan: Records of the Kobe-Type in New Foci and Findings of a New Type Related to the Otsu-Type. *Microbiol Immunol* 2007; 51(1):15-24.

Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, López-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 2008; 155: 190–197.

Souza MJ. One health: zoonoses in the exotic animal practice. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2011;14(3):421-6.

Stieve E, Beckmen K, Kania SA, Widner A, Patton S. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. *J Wildl Dis* 2010; 46: 348–355.

Telford Jr SR, Forrester DJ. 1991. Hemoparasites of raccoons (*Procyon lotor*) in Florida. *J Wildl* 1991; 27: 486–490.

Telford SR, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A. Babesial infection in human and wildlife. In: Kreier, J.P., Baker, J.R. (Eds.), *Parasitic Protozoa*. vol. 5, 7. Academic Press, San Diego, pp. 1–47, 1993.

Thompson CS, Mangold AJ, Félix ML, Carvalho L, Armúa-Fernández MT, Venzal JM. Molecular evidence of *Babesia* species in *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in Uruguay. *Vet Parasitol* 2018; 13: 230-233.

Truppel JH, Montiani-Ferreira F, Lange RR, De Castro RGDO, Reifur L, Boerger W, Thomaz-Soccol V. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitol Int* 2010; 59(3) 376-379.

Uilenberg G. *Babesia* – a historical perspective. *Vet Parasitol* 2006; 138: 3-10.

Yai LO, Ragozo AA, Cañón-Franco WA, Dubey JP, Gennari SM. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. *J parasitol* 2008; 94(3): 766-767.

Anexo A: Autorização do ICMBio para coleta de animais atropelados



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: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* 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: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	CPF: 000.287.830-50
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	NECROPSIA DOS ANIMAIS, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITOS	04/2013	04/2015
2	COLETA DE ANIMAIS ATROPELADOS EM ESTRADAS DE RODAGEM DO RIO GRANDE DO SUL	04/2013	04/2015
3	COLETA DE ANIMAIS ATROPELADOS, NECROPSIA, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITOS	11/2015	10/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exonera o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.bama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	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.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	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 infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1) Este projeto não contempla coletas in situ de vertebrados vivos, mas somente de AMOSTRAS destes (carcaças, vísceras, material osteológico, regurgitos, etc). 2) Os répteis da Ordem Rhynchocephalia não existem em vida livre no Brasil, contudo essa opção inserida pela pesquisadora foi aprovada para não ocasionar divergência de pareceres.
2	Encaminhar à ESEC do Taim a lista das espécies encontradas e a cópia de toda a publicação gerada pela pesquisa, dissertação, artigos, resumos, separatas. Como já existe outro trabalho em andamento com os animais atropelados na UC, é necessário que a pesquisadora comunique um 24 horas de antecedência as coletas, para que não atrapalhe o outro projeto em andamento.
3	Durante a busca ativa nas rodovias, no caso de encontrar animais ainda com vida, recomendo que já haja um protocolo de encaminhamento previamente preparado (ZOOs, CETAS, clínicas veterinárias).

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) 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: 54361312



Página 1/4



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: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* 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: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	CPF: 000.287.830-50
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

1	Gertrud Müller	ORIENTADORA DE POS-GRADUAÇÃO	216.928.730-87	1030796914 SSP-RS	Brasilera
2	Carolina Silveira Mascarenhas	ESTUDANTE DE DOUTORADO	962.916.800-88	7069115496 SJS-RS	Brasilera

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	Estado do Rio Grande do Sul	Fora de UC Federal
2		RS	Estado do Rio Grande do Sul	Fora de UC Federal
3	PELOTAS	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal
4	MORRO REDONDO	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal
5	RIO GRANDE	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal
6	CANGUCU	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal
7	TURUCU	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal
8		RS	ESTACÃO ECOLÓGICA DO TAIM	UC Federal
9	CAPAO DO LEÃO	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDARIAS	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Artiodactyla, Myrmecophagidae, Pilosa, Mephitidae, Alligatoridae, Procyonidae, Mustelidae, Aves, Squamata, Lagomorpha, Xenarthra, Chelidae, Testudinidae, Rodentia, Felidae, Didelphimorphia, Perissodactyla, Canidae, Chelydridae, Didelphidae, Chelonidae, Tapiridae, Cingulata

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Outras amostras biológicas/coleta manual dos animais atropelados, Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele, Ectoparasita
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele, Fezes, Outras amostras biológicas/coleta manual dos animais atropelados, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas/coleta manual dos animais atropelados
4	Amostras biológicas (Répteis)	Outras amostras biológicas/coleta manual dos animais atropelados, Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele, Fezes, Fragmento de tecido/órgão
5	Amostras biológicas (Tamanduás)	Outras amostras biológicas/coleta manual dos animais atropelados, Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
6	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaca)/osso/pele
7	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta/coleta manual dos animais atropelados
8	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta/coleta manual dos animais atropelados
9	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta/coleta manual dos animais atropelados
10	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta/coleta manual dos animais atropelados
11	Método de captura/coleta (Tamanduás)	Coleta manual
12	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta/coleta manual dos animais atropelados

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
---	--------------------	--------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) 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: 54361312



Página 2/4



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: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* 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: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO		CPF: 000.287.830-50
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		CNPJ: 92.242.080/0001-00
1 UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) 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: 54361312



Página 3/4



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: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* 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: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	CPF: 000.287.830-50
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) 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: 54361312



Página 4/4

Anexo B

Normas Brazilian Journal of Development

AUTHOR GUIDELINES

O BJD aceita apenas artigos originais, não publicados em outros periódicos. Aceitamos artigos apresentados em eventos, desde que essas informações sejam disponibilizadas pelos autores.

As normas para formatação e preparação de originais são:

- Máximo de 20 páginas;
- Maximum 8 autores;
- Fonte Times New Roman tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- Figuras, Tabelas e Tabela devem aparecer junto ao texto, editáveis, em fonte 10, tanto para o conteúdo quanto para o título (que deve vir logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve vir logo abaixo do elemento gráfico).
- Título em português e inglês, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo e resumo, juntamente com palavras-chave e palavras-chave, com espaçamento simples, logo abaixo do título;
- O arquivo submetido não deve conter a identificação dos autores.

Esta revista adota como política editorial as diretrizes de boas práticas de publicação científica da Associação Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Administração (ANPAD), disponíveis em: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados abaixo. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outro periódico; Caso contrário, deverá ser justificado em "Comentários ao editor".
- O arquivo de submissão está no formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
- Os URLs para referências foram informados quando possível.
- O texto está em espaço simples; Usa uma fonte de 12 pontos; Usa itálico em vez de sublinhado (exceto endereços de URL); As figuras e tabelas são inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
- O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
- No caso de submissão a uma seção revisada por pares (por exemplo, artigos), as instruções disponíveis em Assegurar avaliação cega por pares foram seguidas.



Brazilian Journal of Development

DECLARAÇÃO

A Revista Brazilian Journal of Development, ISSN 2525-8761 avaliada pela CAPES como Qualis CAPES 2019 B2, declara para os devidos fins, que o artigo intitulado “**Molecular analysis on protozoa in wild mammals run over in southern Rio Grande do Sul, Brazil**” de autoria de Simone Scheer, Márcia Raquel Pegoraro Macedo, Tatiele de Aguiar Lopes Soares, Alice Graciela Suarez, Gertrud Muller, foi publicado no v. 8, n.1, p.7037-7046.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:

<https://brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/issue/view/154>

DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-475>

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 25 de Janeiro de 2022

Prof. Dr. Edilson Antonio Catapan Editor
Chefe

QR de validação da publicação

