

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FRANCIELLE CRISTINA KAGUEYAMA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* e
Leshmania spp. EM FELÍDEOS SILVESTRES DE VIDA LIVRE E DE
CATIVEIRO NO ESTADO DE MATO GROSSO-BRASIL**

Cuiabá – MT

2022

FRANCIELLE CRISTINA KAGUEYAMA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* e *Leshmania spp.* EM FELÍDEOS SILVESTRES DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO NO ESTADO DE MATO GROSSO-BRASIL

Orientadora: Profª. Dra. Valéria Dutra

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Cuiabá – MT

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

K11t KAGUEYAMA, FRANCIELLE CRISTINA.
TÍTULO: DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella abortus*,
Toxoplasma gondii e *Leshmania* spp. EM FELÍDEOS
SILVESTRES DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO NO ESTADO
DE MATO GROSSO-BRASIL. : TÍTULO: DETECÇÃO
MOLECULAR DE *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* e
Leshmania spp. EM FELÍDEOS SILVESTRES DE VIDA LIVRE E
DE CATIVEIRO NO ESTADO DE MATO GROSSO-BRASIL. /
FRANCIELLE CRISTINA KAGUEYAMA. -- 2022
53 f. ; 30 cm.

Orientadora: Valéria Dutra.
Co-orientador: Luciano Nakazato.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2022.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* e *Leshmania* spp. EM FELÍDEOS SILVESTRES DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO NO ESTADO DE MATO GROSSO-BRASIL.

AUTORA: Doutoranda Francielle Cristina Kagueyama

Tese defendida e aprovada em 25 de abril de 2022

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutora Valéria Dutra (Presidente Banca / Orientadora)

Instituição: Univerisidade Federal de Mato Grosso

2. Doutora Fernanda Harumi Maruyama (Examinador Interno)

Instituição: Univerisidade Federal de Mato Grosso

3. Doutor Stéfhanu Luís Cândido (Examinador Interno)

Instituição: Univerisidade Federal de Mato Grosso

4. Doutora Carla Patricia Amarante e Silva (Examinador Externo)

Instituição: Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura de Cuiabá

5. Doutora Maerle Oliveira Maia (Examinador Externo)

Instituição: Médica Veterinária Autônoma

6. Doutora Janaina Marcela Assunção Rosa Moreira (Examinador Suplente)

Instituição: Médica Veterinária Autônoma



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA DUTRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 05/05/2022, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Patricia Amarante e Silva, Usuário Externo**, em 06/05/2022, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefhano Luis Candido, Usuário Externo**, em 06/05/2022, às 21:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maerle Oliveira Maia, Usuário Externo**, em 07/05/2022, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Harumi Maruyama, Usuário Externo**, em 07/05/2022, às 22:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4668049** e o código CRC **909B301E**.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Francisco Tadao Kagueyama e Gilda M. A. Kagueyama e aos meus filhos amados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me sustentar e guiar nessa caminhada.

A minha orientadora Valéria Dutra e meu coorientador Luciano Nakazato. obrigada pela oportunidade, por toda orientação e ensinamentos.

Agradeço a Fer, pela amizade, assistência, a ajuda de todas as horas ... obrigada por sua participação presencial nessa conquista.

Á todos colegas e amigos do Laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular que estiveram comigo nessa caminhada.

Agradeço também a toda minha família, meu pai, minha mãe, irmãos, meus filhos e ao Henrique, obrigada pelo apoio que me deram em todas as horas e nas mais diversas formas.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e ao Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET).

RESUMO

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania spp.* EM FELÍDEOS SILVESTRES DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO NO ESTADO DE MATO GROSSO – BRASIL

A maioria das doenças infecciosas emergentes são predominantemente zoonoses sendo a grande parte de origem silvestre. Os felídeos silvestres desempenham importante papel na epidemiologia de patógenos que podem afetar a saúde tanto de animais domésticos como silvestres e a saúde humana, servindo como hospedeiros reservatórios. Dessa forma o objetivo foi diagnosticar através da técnica molecular da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) as espécies de *B. abortus*, *T. gondii* e *Leishmania spp.* em amostras de sangue de felídeos silvestres de vida livre e de cativeiro do Estado do Mato Grosso, Brasil. Foram testadas 23 amostras sanguíneas de 06 espécies de felídeos silvestres (*Leopardus colocolo*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Pantera onca*, *Puma concolor* e *Puma yagouaorundii*). *B. abortus* foi detectada em 4,34% (1/23), um *Puma concolor* de cativeiro. *T. gondii* estava presente 13,04% dos felídeos (3/23), sendo 2 animais de vida livre (*Leopardus colocolo* e *Leopardus pardalis*) e 1 animal de cativeiro (*Puma concolor*). *Leishmania spp.* estava presente 8,69% dos felídeos (2/23), sendo 2 animais de vida livre (*Leopardus pardalis* e *Puma concolor*). Os resultados obtidos demonstram que os microrganismos *B. abortus*, *T. PCR gondii* e *Leishmania spp.* estão presentes em felídeos silvestres. Esses animais desempenham importante papel na função ecológica, uma vez que são portadores de patógenos infecciosos mesmo sem o desenvolvimento de doença clínica. A detecção em animais de cativeiro e de vida livre demonstra a importância do monitoramento relacionado a agentes etiológicos de caráter zoonótico, para que possam ser adotadas medidas terapêuticas e profiláticas adequadas.

Palavras chave: PCR, zoonoses, felídeos silvestres, doenças emergentes

ABSTRACT

DETECTION MOLECULAR OF *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* and *Leishmania spp.* IN FREE-LIVING AND CAPTIVITY FELIDS IN THE STATE OF MATO GROSSO - BRAZIL

Most emerging infectious diseases are predominantly zoonoses, most of which are of wild origin. Wild felids play an important role in the epidemiology of pathogens that can affect the health of both domestic and wild animals and human health, serving as reservoir hosts. Thus, the objective was to diagnose through the molecular technique of PCR (Polymerase Chain Reaction) the species of *B. abortus*, *T. gondii* and *Leishmania spp.* in blood samples from wild and captive wild felids from the State of Mato Grosso, Brazil. Twenty-three blood samples from 6 species of wild felids (*Leopardus colocolo*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Panthera onca*, *Puma concolor* and *Puma yagouaorundii*) were tested. *B. abortus* was detected in 4.34% (1/23), a captive *Puma concolor*. *T. gondii* was present in 13.04% of the felids (3/23), being 2 free-living animals (*Leopardus colocolo* and *Leopardus pardalis*) and 1 captive animal (*Puma concolor*). *Leishmania spp.* 8.69% of the felids were present (2/23), being 2 free-living animals (*Leopardus pardalis* and *Puma concolor*). The results obtained demonstrate that the microorganisms *B. abortus*, *T. gondii* and *Leishmania spp.* are present in wild felids. These animals play an important role in the ecological function, since they are carriers of infectious pathogens even without the development of clinical disease. The detection in captive and free-living animals demonstrates the importance of monitoring related to zoonotic etiological agents, so that appropriate therapeutic and prophylactic measures can be adopted.

Keywords: PCR, zoonosis, wild felids, emerging diseases

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Patógenos, sequência dos oligonucleotídeos, composição das reações e protocolo de amplificação para realização das PCRs

Tabela 2: Resultados das Pcrs de acordo com a espécie, o *habitat* e os patógenos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	Teste do 2-Mercaptoetanol
%	Porcentagem
µm	Micrómetro
°C	Grau Celsius
AAT	Acidificado Tamponado
B19	Vacina contra brucelose bovina produzida da cepa B19
CFT	<i>Coombs</i> e fixação de complemento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INDEA/MT	Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Teste Imuno Enzimático
HOVET	Hospital Veterinário
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBPT	Teste de Soroaglutinação com Antígeno Brucélico Corado pelo Rosa Bengala
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAT	Soroaglutinação em Tubo
TAL	Teste do Anel do Leite
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Microorganismos.....	15
2.1.1 <i>Brucella abortus</i>	15
2.1.2 Diagnóstico	16
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.2.1 Diagnóstico.....	18
2.3 <i>Leishmania spp.</i>	18ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.3.1 Diagnóstico	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Amostras.....	21
4.2 Extração de ácidos nucleicos	21
4.3 Preparação do modelo de DNA	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE A	36
APÊNDICE B	42
ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO DO PERIÓDICO	49
ANEXO B - CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DOS ARTIGOS	51

1 INTRODUÇÃO

O Estado de Mato Grosso é o único do país que engloba elementos bióticos dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal sendo um *hotspot* de biodiversidade global. Esses biomas sofrem com a expansão da agricultura e pecuária que, segundo o Instituto de Defesa Agropecuária (INDEA) do Estado de Mato Grosso, detém 32,7 milhões de bovinos, sendo o maior produtor efetivo do país (IBGE, 2019; INDEA, 2022).

Com essa deterioração do habitat natural dos felídeos silvestres juntamente com a caça predatória e a escassez de presas para sua alimentação, o aumento na ocorrência de doenças infecciosas e zoonóticas tem sido um problema na conservação dos felídeos silvestres (NOWELL E JACKSON, 1996; FUNK et al., 2001). Assim, as doenças infecciosas e zoonóticas que repercutem negativamente em espécies silvestres, como a *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) e *Leishmania* spp., representam um perigo para saúde humana e animal (MISHRA et al., 2022).

A *B. abortus* é uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo, com mais de 500.000 novos casos a cada ano (GODFROID et al., 2017). A pesquisa sobre *Brucella* sp. em animais silvestres são limitadas, principalmente em felídeos, além de ser difícil mensurar o impacto das infecções na vida silvestre na reemergência em animais e humanos, uma vez que a transmissão raramente é descrita e é pouco conhecida (DADAR et al., 2021).

Em relação a toxoplasmose, estima-se que quase 30% da população humana mundial teve contato com o *T. gondii*, sendo essas infecções na maioria das vezes assintomáticas, no entanto podem levar a efeitos deletérios, principalmente em casos congênitos e em pessoas imunocomprometidas (JAFARI-MODREK et al., 2019; SAFARPOUR et al., 2020). Os felídeos são considerados hospedeiros definitivos, sendo responsáveis pela eliminação do parasita no ambiente, através da excreção de milhões de oocistos em suas fezes que podem sobreviver no solo mesmo por anos. Nos felídeos silvestres, esse patógeno pode agir negativamente na conservação da espécie e reintrodução do animal a natureza (ULLMANN et al., 2010).

Já o protozoário do gênero *Leishmania* é considerado um parasita intracelular obrigatório que acomete humanos e animais (TOLENTINO et al., 2019). Traz graves problemas de saúde única e estima-se que um bilhão de pessoas vivam em áreas de risco para pelo menos uma das formas clínicas da doença, cutânea ou visceral, e cerca de 556 milhões de pessoas estão sob o risco de desenvolver a leishmaniose visceral (OMS, 2022). Felídeos silvestres são ocasionalmente diagnosticados com leishmaniose, mas tem sido relatada em áreas endêmicas

para leishmaniose humana e canina (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). O Estado de Mato Grosso é uma região endêmica para leishmaniose, e já foram identificados felídeos silvestres de cativeiros com *Leishmania* sp. (DAHROUG et al., 2010) bem como felinos domésticos (MADRUGA et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Os felídeos silvestres são animais que em seu ambiente natural percorrem diversos territórios para sua sobrevivência. Dessa forma, estão expostos a patógenos presentes no ambiente ou proveniente de sua alimentação. Considerando o grau de vulnerabilidade das espécies de felídeos silvestres, juntamente com a diminuição dos seus habitats e a existência de diversos felídeos em cativeiro, se faz necessário o monitoramento de potenciais agentes infecciosos para uma melhor compreensão da saúde silvestres, contribuindo dessa forma para ações de conservação, que estão em sua maioria em risco de extinção, seja em ambiente natural ou de cativeiro (NOWEL; JACKSON, 1996; Adania et al. 2014). Além disso, essa proximidade dos animais de cativeiro com humanos e animais doméstico pode aumentar o risco de reemergência de patógenos, servindo como sentinelas de riscos à saúde humana, animais domésticos e outras espécies silvestres (YON et al., 2019).

Diante disso, a monitorização dessas zoonoses em felídeos silvestres é importante para conhecer o papel epidemiológico desempenhado como hospedeiros e/ou reservatório. Logo, o objetivo deste estudo foi detectar o DNA de *B. abortus*, *T. gondii* e de *Leishmania* spp. através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras sanguíneas de cinco espécies de felídeos silvestres pertencentes a vida livre e a cativeiro no Estado de Mato Grosso, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos

2.1.1 *Brucella abortus*

B. abortus é uma bactéria intracelular pertencente ao Filo Proteobacteria e a classe Alphaproteobacteria. É um patógeno infectocontagioso e zoonótico conhecido por causar brucelose principalmente em bovinos e humanos, mas pode acometer outras espécies de animais tornando sentinelas em muitos casos (MORENO, 2014; SANTOS et al., 2020).

A transmissão ocorre pelas vias nasal e oral através de inalação de aerossóis e pelo consumo produtos infectados (SANTOS et al., 2020). É uma doença sistêmica no qual diversos órgãos ou tecidos do corpo podem estar envolvidos. Nos animais causa principalmente abortos que costumam ocorrer após a primeira infecção, infertilidade, nascimento de animais fracos ou natimortos (MORENO, 2014).

Dados de notificação da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) indicam vários casos suspeitos ou confirmados de brucelose em animais silvestres, especialmente infecção por *B. abortus*. Animais silvestres são suscetíveis à infecção e podem transmitir para outras espécies de animais silvestres e domésticos (CROSS et al., 2010). Apesar de número substancial de estudos e relatórios mundiais, ainda não há estimativas precisas sobre a prevalência da *Brucella* em felídeos silvestres (DADAR et al., 2021).

Em muitas áreas, a epidemiologia da brucelose na vida silvestre está intimamente associada à ocorrência da doença na pecuária. Algumas espécies silvestres podem contribuir para a reintrodução de infecções por *Brucella* em bovinos, mesmo em regiões oficialmente livres de brucelose (DADAR et al., 2021).

Infecções de felídeos de vida livre por diferentes espécies de *Brucella* vem sendo amplamente divulgados na literatura e existem desde o início do século XX (KOSOY; GOODRICH, 2019). Entretanto, ainda existem poucas informações sobre a *Brucella* em felídeos silvestres e os estudos conduzidos de detecção do patógeno foram em sua maior parte por técnicas sorológicas e bacteriológicas (KOSOY; GOODRICH, 2019).

Animais de zoológico também são acometidos por *Brucella* spp. e uma possível fonte de infecção pode ser pela ingestão de carne, fruta, legumes e água contaminadas (OLIVEIRA-FILHO et al., 2012). É importante destacar que a maioria dos animais introduzidos nos zoológicos são os confiscados por órgãos governamentais que estavam em situações ilegais ou

abusivas, incluindo serem criados como animais de estimação, no qual podem ter uma dieta variada. Com isso, é difícil determinar onde os animais de cativeiros foram expostos ao patógeno, se no ambiente doméstico, silvestre ou mesmo durante seu cativeiro.

Para Almeida et al. (2013), a presença de *Brucella* spp. em zoológico levanta um crescimento preocupante com a possibilidade de transmissão entre humanos, animais silvestres e domésticos, resultando em graves problemas socioeconômicos e saúde pública.

2.1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial baseia-se em métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos representados pela sorologia como, teste de Soroaglutinação com Antígeno Brucélico corado pelo Rosa Bengala (RBPT) que é o mesmo Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), a soroaglutinação em tubo (SAT), Coombs e Fixação de Complemento (CFT), Teste do Anel do Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e o Teste Imunoenzimático (ELISA) (AKHVLEDIANI et al., 2017).

Já os métodos diretos fazem referência ao isolamento do patógeno, que é considerado o padrão-referência, porém isolados de *Brucella* são de difícil cultivo e requerem condições especiais de segurança no laboratório (AKHVLEDIANI et al., 2017), e a detecção do agente pela PCR (DAHOUL et al., 2013).

Os métodos indiretos são os mais utilizados para o diagnóstico, pois permitem o diagnóstico de mais de 95% dos casos (LAWINSKY et al., 2010). De acordo com Dahouk et al. (2013), os testes sorológicos são mais rápidos, sensíveis e eficazes, todavia não devem ser realizados isoladamente como único teste de escolha.

A detecção do DNA bacteriano pela PCR por sua vez é mais sensível e rápida que o isolamento bacteriano e mais específico que os testes sorológicos servindo para a confirmação da espécie de *Brucella* envolvida como para a detecção do microrganismo em hospedeiros sem sinais clínicos.

A utilização de biologia molecular mostra uma boa opção para o diagnóstico de brucelose visto que identifica novas espécies de *Brucella* de humanos, animais domésticos e silvestres (SCHOLZ; VERGNAUD, 2013).

2.1.2 *Toxoplasma gondii*

Pertencente ao Filo Apicomplexa, o *T. gondii* é um protozoário zoonótico que infecta humanos e animais domésticos e silvestres (DUBEY et al., 2009). Possui como hospedeiro definitivo as espécies felídeas, que são responsáveis por liberarem oocistos pelas fezes contaminando o ambiente e os demais animais desempenham o papel de hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2009).

A disseminação da toxoplasmose é de maior prevalência em países de clima quente e baixa latitude, onde favorecem a esporulação e a sobrevivência dos oocistos (SOUZA e BELFORT JR., 2014). A transmissão da toxoplasmose se dá principalmente através da ingestão dos oocistos esporulados, presentes em alimentos e na água (HILL e DUBEY 2002).

T. gondii possui a característica de multiplicar-se em todas as células nucleadas do hospedeiro humano ou animal. Esse protozoário é responsável mais comumente por casos de infecção assintomática, porém quadros clínicos de abortamento, encefalites, uveítes e até morte são relatados tanto em animais como em humanos (GARCIA et al., 1999; JONES et al., 2000; ABU-DALBOUH et al., 2012). Os membros da família Felídea, ou seja, gatos domésticos e silvestres, são as espécies animais-chave para a manutenção do *T. gondii* (ELMORE et al., 2010). A eliminação dos oocistos nas fezes, é durante um período de 10 a 15 dias permanecendo viáveis e infectantes por mais de um ano em condições favoráveis (DUBEY, 2004; DUBEY; JONES, 2008; WEISS; DUBEY, 2009). A ativação da imunidade humoral e a produção de anticorpos impedem extravasamento de oocistos; no entanto, novos episódios de excreção podem ocorrer caso desenvolvam imunossupressão grave (DUBEY, 1995; JONES et al., 2008).

O estilo de vida dos felídeos silvestres influencia na ocorrência de infecção e manutenção do *T. gondii*, uma vez que esses animais são carnívoros e caçam para se alimentar. (HATAM-NAHAVANDI et al., 2021). As infecções pelo protozoário já foram descritas em felídeos silvestres de cativeiro (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013), pois felídeos domésticos estão frequentemente presentes nesses locais, juntamente com animais sinantrópicos, que constituem presas potenciais para carnívoros (ZARNKE et al., 2001). Além disso, carne bovina e de aves utilizadas na alimentação de animais silvestres em zoológicos podem ser importantes fontes de infecção (ANDRÉ et al., 2010).

2.1.2.1 Diagnóstico

A infecção pelo *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente, através de métodos sorológicos, e diretamente, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), hibridação, isolamento e anatomopatologia. O diagnóstico indireto é a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* no soro dos humanos e dos animais (REAGHI et al., 2011; PEREIRA et al., 2012), enquanto os métodos diretos têm como objetivo demonstrar a presença do *T. gondii* nos tecidos, excreções ou fluidos corporais (VELARDE et al., 2009).

A realização do diagnóstico molecular através de PCR foi descrita em meados da década de 80 (BURG et al., 1989). Diversos materiais como sangue, leite e tecidos como o cerebral, musculo cardíaco e esquelético, são utilizados para a extração e pesquisa de DNA de *T. gondii* (ESTEBRAN et al., 1998; MASON et al., 2010; CAMOSSO et al., 2011; SPALDING et al., 2013).

2.1.3 *Leishmania* spp.

Os protozoários responsáveis pela leishmaniose são gênero *Leishmania*, pertencentes à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae (ROSS 1903). São microrganismos pleomórficos com formas promastigotas (flageladas e extracelulares) e amastigotas (aflageladas e intracelulares) que se reproduzem assexuadamente humanos, animais domésticos e silvestres (NASCIMENTO et al., 2021).

Já foram descritas 22 (vinte e duas) espécies patogênicas para humanos. Conforme a espécie de *Leishmania* envolvida e a sua relação com seu hospedeiro, podendo apresentar 3 formas clínicas, muco cutânea, cutânea ou visceral (LONGONI et al., 2012).

Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres ou domésticos. Os caninos desempenham papel importante na transmissão da doença uma vez que são reservatórios naturais (SOLANO GALLEGOS et al., 2009). Em relação a hospedeiro invertebrados no Brasil temos as fêmeas de insetos dípteros do gênero *Lutzomyia* (Chang et al, 1985).

Já foram detectadas em pequenos roedores, ovinos, caprinos, equídeos e felídeos domésticos (NEAFIE e CONNOR, 1976; WILLIAMS et al., 1991; VAN DER LUGT et al., 1992; OZON et al., 1998; KOEHLER et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2021).

Registros de leishmaniose felina vem aumentando em gatos domésticos quando comparado aos silvestres no continente americano, em especial no Brasil (SOARES et al., 2016; ASFARAM et al., 2019).

O primeiro relato em felino no Brasil, foi em um gato doméstico (PASSOS et al., 1996). No entanto, Savani et al. (2010), no Estado de São Paulo, detectaram o primeiro caso autóctone da leishmaniose felina, no qual foi confirmado a presença de *L. infantum*. As espécies mais comuns que acometem os felinos no Brasil são *Leishmania braziliensis*, *L. infantum* e *Leishmania amazonenses* (SOUZA et al. 2005; FIGUEIREDO et al. 2009; CARNEIRO et al. 2020; COSTA-VAL et al. 2020).

Os carnívoros domésticos e silvestres são considerados reservatórios da *L. infantum*, os sinais clínicos da leishmania visceral são mais frequentes em canídeos silvestres do que nos felinos (ROQUE et al., 2014, SOUZA et al., 2014).

Felídeos silvestres são ocasionalmente diagnosticados com leishmania, mas tem sido relatada em áreas endêmicas para leishmaniose humana e canina (SOARES et al., 2016; PENNISI; PERSICHETTI, 2018).

Felídeos silvestres assintomáticos foram relatados como positivos para *L. chagasi* no Estado de Mato Grosso, Brasil, onde 05 (cinco) pumas (*Puma concolor*) e 01 (uma) onça-pintada (*Panthera onca*) tiveram amostras de sangue positivas detectadas pela técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) (DAHROUG et al., 2010).

Dahroug et al. (2011), relataram o primeiro caso de *L. chagasi* em leão africano (*Panthera leo*), sem sinais clínicos, através do PCR-RFLP, mantidos em zoológico em Mato Grosso.

A PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizada para detectar o DNA de *Leishmania sp.* em 04 (quatro) felídeos silvestres pertencentes ao Zoológico de Brasília, representados por 02 (dois) gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), 01 (uma) jaguatirica (*Leopardos pardalis*) e 01 (um) puma (*Puma concolor*) (REIS et al., 2019).

2.1.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose é realizado através de testes laboratoriais, como o exame parasitológico, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (PEREIRA et al., 2008).

A forma amastigota do parasito em macrófagos é evidenciada por exame microscópico após escarificação, biópsia com impressão por aposição ou punção aspirativa da medula óssea, baço e nódulo linfático (ROMERO e BOELAERT 2010).

Ensaio sorológicos utilizados destacam-se a Imunofluorescência Indireta (IFA), Ensaio de Imunoenzimático (ELISA) (LUPPI et al., 2008), ligante de Fucose-Manose-ELISA (FML-ELISA) (SANTIAGO et al., 2007), Ensaio de tira Imunocromatográfica (ICT) (MOLINA et al., 2012; ROSYPAL et al., 2010), Teste de Aglutinação Direta (DAT) (MOHEBALI et al., 2005)

Para o diagnóstico molecular utiliza-se a medula óssea, nódulo linfático, baço e tecidos de pele, no entanto, o sangue é a amostra geralmente mais usada para os testes moleculares. E das técnicas moleculares utilizadas a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR é a de maior destaque (LUPPI et al., 2008).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Detectar molecularmente agentes patogênicos de felídeos silvestres de vida livre e cativeiro do Estado de Mato Grosso, Brasil, e verificar eventuais reservatórios de zoonoses.

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar a presença de DNA de *B. abortus*, *T. gondii* e *Leishmania* spp. em amostras de sangue total de felídeos silvestres de vida livre e de cativeiro pertencente ao Estado de Mato Grosso, Brasil, por meio da técnica de PCR.
- Analisar os resultados a fim de obter um panorama de agentes patogênicos de felídeos silvestres do Estado de Mato Grosso.
- Verificar a presença de eventuais patógenos que estão associados diretamente à conservação dos felídeos em vida livre ou em cativeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Declaração de Ética

A coleta foi realizada de acordo com o “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO) sob os números: 40617-1 e 42303.

4.2 Amostras

Entre o período de agosto de 2014 a agosto de 2018 foram coletadas amostras de sangue (1mL) do total de 23 felídeos silvestres, sendo 10 (dez) oriundos de cativeiro no qual pertenciam ao Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (ZOO-UFMT) e 13 (treze) de vida livre que foram resgatados por órgãos governamentais para atendimento no setor de clínica médica de animais silvestres Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT).

As amostras de sangue foram armazenadas em tubos de polipropileno estéreis individualmente, e encaminhados ao laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, campus Cuiabá.

4.3 Extração de Ácidos Nucléicos

A extração de material genético das amostras foi realizada utilizando 250µL de sangue acrescido de 1mL de tampão de lise (100mM NaCl, 25mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS e 0,1mg Proteinase K), que foi incubado a 56°C overnight e, posteriormente, tratado com método de fenol-clorofórmio de acordo com o protocolo de Sambrook e Russel (2004). O DNA foi ressuspensão em 50µL água ultrapura e armazenado à -20°C até a sua utilização.

Para cada reação incluiu-se um tubo de controle positivo usando DNA de acordo com patógeno específico purificado e um tubo de controle negativo contendo água ultrapura.

Posteriormente as reações foram processadas em termociclador ProFlex PCR (Life Technologies) (tabela 1).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com Gel Red (Biotium), posteriormente visualizados em ChemiDoc™ XRS usando o software ImageLab™. O marcador de massa molecular empregado foi o *Ladder* 100pb (Sigma).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do DNA das amostras de sangue para *B. abortus* foi detectado em 4,35% (01/23) *Puma concolor* que era mantido em cativeiro.

É difícil determinar se este animal foi exposto em vida livre ou em cativeiro, devido à ausência de histórico. Existem poucas informações sobre a prevalência da *Brucella* spp. em felídeos silvestres (KOSOY & GOODRICH, 2019).

Provavelmente uma fonte de infecção dos felídeos criados em cativeiros seria a dieta fornecida a eles onde na maioria das vezes é composto por vísceras e fetos (ALMEIDA et al., 2013).

Almeida et al. (2013) detectaram PCR positivos para *B. abortus* em *P. onca* e *L. pardalis*, e *B. canis* em *P. concolor* em animais de cativeiros.

Em relação a sorologia, algumas espécies como a *Panthera leo* da Tanzânia, *P. onca* e *P. concolor* do Brasil e *Lynx rufus* dos Estados Unidos foram positivas para *B. abortus* (SACHS et al., 1968; HOQ, 1978; ALMEIDA et al., 2013; FURTADO et al., 2015).

Já os anticorpos para *B. canis* foram detectados em *L. rufus* dos Estados Unidos, *P. concolor* e *L. pardalis* no Brasil (HOFF et al., 1974; ALMEIDA et al., 2013). E Furtado et al (2015) detectaram 01 (uma) *Panthera onca* de vida livre no bioma Cerrado soropositiva para *Brucella* spp.

De acordo com Amjadi et al (2019), a *Brucella* pode ser transmitida pelo contato com as vias respiratórias, lesões na pele e trato gastrointestinal. Assim, nos animais selvagens a infecção ocorre pelo contato com animais infectados ou como uma infecção natural persistente em populações suscetíveis.

O livre acesso de animais domésticos aos recintos dos animais de cativeiro é um outro fator de risco para a propagação desses patógenos, uma vez que os animais domésticos podem representar um reservatório de infecção para a vida selvagem, humanos e animais domésticos além de desempenhar um papel significativo na persistência da infecção (WARETH et al 2017).

Com relação ao *T. gondii*, foi detectado seu DNA em *L. colocolo*, *L. pardalis* de vida livre e *P. concolor* que era mantido no zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso.

Nossos resultados revelaram um total de 13,04% (03/23) animais positivos para a PCR *T. gondii*, sendo 02/13 felídeos de vida livre e 01/10 de cativeiro. O que é um indicativo de uma parasitemia que pode ser uma reativação da toxoplasmose latente, ou decorrente de uma infecção primária e até mesmo uma reinfeção com genótipo diferente de *T. gondii*, uma vez

que esta pode ser estabelecida e circular na corrente sanguínea até imunidade específica se desenvolver contra o parasito (GOMEZ-RIOS 2019). No Estado de Mato Grosso, foi detectado DNA de *T. gondii* em 1/3 Jaguatirica de vida livre (*L. pardalis*) (WITTER et al., 2020).

Foi relatado na região nordeste do Brasil, o isolamento de *T. gondii* em felídeos de cativeiro, em 01 gato mourisco (*P. yagouaroundi*) (PENA et al. 2011) e em 01 gato do mato (*Leopardus tigrinus*) (VITALIANO et al., 2014).

E no Estado do Rio Grande do Sul, foram isolados *T. gondii* em 9/22 jaguarondi (*P. yagouaroundi*), 6/22 Gatos do mato grande (*Leopardus geoffroyi*), 8/28 gatos do mato (*L. tigrinus*), 6/10 Gatos maracajá (*L. wiedii*), 1 Jaguatirica (*L. pardalis*) e 1/7 gato-palheiro (*L. colocolo*) todos felídeos silvestres de vida livre (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013).

A manutenção do *T. gondii* em felídeos silvestres de cativeiro e os de vida livre está associada à forma como são alimentados e conseqüentemente como são infectados (HATAM-NAHAVANDI et al., 2021).

Outro protozoário pesquisado em nosso estudo, a *Leishmania* spp., foi detectada em 8.69% 02/23 felídeos, dentre eles 01 *P. concolor* e 01 *L. pardalis* ambos de vida livre.

No Brasil, os felinos são confirmados como potenciais reservatórios de *leishmania* spp. (MENDONÇA et al. 2020). Sendo o Estado de Mato Grosso uma região endêmica para leishmaniose visceral (DIAS et al., 2019; DIAS et al, 2021) e que em áreas endêmicas há possibilidade de infecção da fauna silvestre por este protozoário.

A infecção natural de *Leishmania (leishmania) infantum* no Mato Grosso foi descrita em animais de cativeiros como jaguatirica (*L. pardalis*), puma (*P. concolor*), onça (*Panthera onca*) e leão africano (*Panthera leo*) (DAHROUG et al., 2010; DAHROUG et al., 2011).

Por outro lado, em animais de vida livre há o relato apenas em uma onça-pintada no México (ZARZA et al., 2015). O felídeo *P. concolor* e o *L. pardalis* positivos na PCR para *Leishmania* spp. realizadas em nosso estudo são animais de vida livre e não tiveram relato de sinais clínicos, o que foi verificado por outros autores que encontraram felídeos infectados por *L. L. infantum* sem manifestações clínicas (DAHROUG et al., 2010; DAHROUG et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os microorganismos *B. abortus*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp. circulam entre espécies felídeas silvestres que habitam o Estado de Mato Grosso. Esses animais desempenham um importante papel na função ecológica, como

portadores de patógenos infecciosos e tornando indicadores da saúde ambiental, mesmo sem o desenvolvimento de doença clínica.

A detecção desse patógeno em animais de cativeiro por meio de ferramentas moleculares mostra a importância desse monitoramento relacionado a agentes etiológico de caráter zoonótico, trazendo preocupações sobre a possibilidade de transmissão entre humanos e animais silvestres e domésticos, principalmente em regiões de grande biodiversidade e interesse ecológico, como o Estado do Mato Grosso.

Tabela 1. Patógenos, sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado composição das reações e para realização das PCR

Patógenos	Primers	Amplificação Reações	Protocolo de Amplificação	Autores
<i>Brucella abortus</i>	5'-GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC-3'	10ng de DNA	Desnaturação inicial (94°C por 5 min.)	BRICKER & HALLING, 1940
	5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TGC CAG -3'	500 pb 8 pmol primer 0,2nM de dNTPs 3mM de MgCl ₂ 1x PCR buffer 10x (200mM Tris-HCL pH 8.4 e 500mM KCl) 1U de taq DNA polimerase volume final: 25µL	35 ciclos de desnaturação (94°C por 15 seg.) Hibridização (60°C por 45 seg.) Extensão (72°C por 30 seg.) 01 ciclo de extensão final (72°C por 5 min.)	
<i>Toxoplasma gondii</i>	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'	8 pmol primer	Desnaturação inicial (95°C, 5min)	BURG et al. 1989
	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	194 pb 2.7mM MgCl ₂ 1x PCR buffer (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; pH 8.4) 0.2mM DNTPs 1U Taq DNA polymerase 10ng DNA volume final: 25µl	30 ciclos (95°C, 30 seg.) Hibridização(56°C, 45 seg.) Extensão (72°C, 2 min.) 01 ciclo de extensão final (72°C, 5 min.)	
<i>Leishmania sp.</i>	5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3'	10ng DNA	Desnaturação inicial (94°C, 4 min.)	DEGRAVE et al. 199
	5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'	120 pb 0.2 dNTPs (1 mM) 3 pmol Primer 1U Taq DNA polymerase 1x PCR buffer (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; pH 8.4) 2 mM MgCl ₂ volume final: 20 µL	30 ciclos (94°C, 30 seg.) Hibridização (60°C, 30 seg.) Extensão (72°C, 30 seg.) 01 ciclo de extensão final (72°C, 10 min.)	

Tabela 2. Resultados das Pcrs de acordo com a espécie, o habitat e os patógenos.

Identificação	Espécies felídeas	Origem	Município	<i>Leishmania sp.</i>	<i>Toxoplas</i>
M941/14	<i>Leopardus colocolo</i>	Vida Livre	Várzea Grande	0	
M953/14	<i>Leopardus pardalis</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M1328/14	<i>Puma concolor</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M474/15	<i>Puma concolor</i>	Vida Livre	Pontes e Lacerda	0	
M609/15	<i>Puma yagouaroundi</i>	Vida Livre	NI	0	
M922/15	<i>Panthera onca</i>	Vida Livre	Marcelândia	0	
M1446/15	<i>Leopardus pardalis</i>	Vida Livre	Várzea Grande	0	
M382/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M462/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Vida Livre	Barra do Bugres	0	
M708/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M849/16	<i>Puma concolor</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M857/16	<i>Puma concolor</i>	Vida Livre	Acorizal	0	
M1013/16	<i>Panthera onca</i>	Vida Livre	NI	0	
M1036/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M1037/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M1102/16	<i>Puma concolor</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M1226/16	<i>Leopardus pardalis</i>	Vida Livre	Barra do Bugres	0	
M75/17	<i>Puma concolor</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M787/17	<i>Leopardus wiedii</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
M1309/17	<i>Puma concolor</i>	Vida Livre	Tangará da Serra	0	
M937/18	<i>Puma concolor</i>	Vida Livre	Cáceres	1	
M982/18	<i>Leopardus pardalis</i>	Vida Livre	Varzea Grande	1	
M1242/18	<i>Panthera onca</i>	Cativeiro	Cuiabá	0	
TOTAL				2 (8,69%)	3 (13)

NI- Não Informado

REFERÊNCIAS

- ABU-DALBOUH, M. A.; ABABNEH, M. M.; GIADINIS, N. D.; LAFI, S. Q. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. **Tropical Animal Health and Production**. 2012 Jan;44(1):49-54. doi: 10.1007/s11250-011-9885-2. Epub 2011 Jun 4. PMID: 21643666.
- ADANIA, C.H; SILVA, J.C.R; FELIPPE, P.A.N. Carnívora – *Felidade*. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R; CATÃO DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca. Cap. 37.p.864-906, 2014.
- ADHIKARI, S. P.; MENG, S.; WU, Y. J.; MAO, Y. P.; YE, R. X.; WANG, Q. Z.; SUN, C.; SYLVIA, S.; ROZELLE, S.; RAAT, H.; ZHOU, H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of *coronavirus* disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. **Infectious Diseases of Poverty**. 2020 Mar 17;9(1):29. doi: 10.1186/s40249-020-00646-x. PMID: 32183901; PMCID: PMC7079521.
- AKHVLEDIANI, T.; BAUTISTA, C.T.; GARUCHAVA, N.; SANODZE, L.; KOKAIA, N.; MALANIA, L.; CHITADZE, N.; SIDAMONIDZE, K.; RIVARD, R.G.; HEPBURN, M.J.; NIKOLICH, M.P.; IMNADZE, P.; TRAPAIDZE, N. Epidemiological and Clinical Features of Brucellosis in the Country of Georgia. **PLoS One**. 2017 Jan 20;12(1):e0170376. doi: 10.1371/journal.pone.0170376. PMID: 28107444; PMCID: PMC5249056.
- ALI, S.; AKHTER, S.; NEUBAUER, H.; MELZER, F.; KHAN, I.; ABATIH, E.N.; EL-ADAWY, H.; IRFAN, M.; MUHAMMAD, A.; AKBAR, M.W.; UMAR, S.; ALI, Q.; IQBAL, M.N.; MAHMOOD, A.; AHMED, H. Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan. **BMC Res Notes**. 2017 Jan 28;10(1):73. doi: 10.1186/s13104-017-2394-2. PMID: 28129787; PMCID: PMC5273848.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; SILVA, C.P.A.; PITCHENIN, L.C.; DAHROUG, M.A.A.; DA SILVA, G.C.P.; SOUSA, V.R.F.; DE SOUZA, R.L.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. *Brucella abortus* and *Brucella canis* in captive wild felids in Brazil. **Int. Zoo Yh**. 2013; 47. doi: 10.1111/j.1748-1090.2012.00188.x.
- AMJADI O., RAFIEI A. MARDANI, M. ZAFARI, P. ZARIFIANSSUE, A A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. **Infectious Diseases**. Vol. 51, 2019. doi.org/10.1080/23744235.2019.1568545
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M.; MACHADO, S. T.; DE BORTOLLI, C. P.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **Journal Parasitology**. 2010 Oct;96(5):1007-9. doi: 10.1645/GE-2502.1. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20950109.
- ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including tropical**. 2019 Jun 10;25:e20190012. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0012. PMID: 31258555; PMCID: PMC6583674.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction.

Journal of Clinical Microbiology. 1989 Aug;27(8):1787-92. doi: 10.1128/jcm.27.8.1787-1792.1989. PMID: 2768467; PMCID: PMC267672.

CAMOSSI, L. G.; GRECA-JÚNIOR, H.; CORRÊA, A. P.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; SILVA, R. C.; DA SILVA, V.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**. 2011 May 11;177(3-4):256-61. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.007. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21216534.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A, LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary Parasitology**. 2013 Nov 8;197(3-4):462-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.019. Epub 2013 Jul 20. PMID: 23932730.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A, LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary Parasitology**. 2013 Nov 8;197(3-4):462-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.019. Epub 2013 Jul 20. PMID: 23932730.

CARNEIRO, L. A.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; LIMA, L. V. D. R.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B.; SILVEIRA, F. T. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports - Journal**. 2020 Jan;19:100360. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100360. Epub 2019 Dec 3. PMID: 32057387.

COSTA-VAL, A. P. D.; COURA, F. M.; BARBIERI, J. M.; DINIZ, L.; SAMPAIO, A.; REIS, J. K. P. D.; BUENO, B. L.; GONTIJO, C. M. F. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2020 Jun 8;29(2):e003520. doi: 10.1590/S1984-29612020023. PMID: 32520088.

CROSS, P.C.; COLE, E.K.; DOBSON, A.P.; EDWARDS, W.H.; HAMLIN, K.L.; LUIKART, G.; MIDDLETON, A.D.; SCURLOCK, B.M.; WHITE, P.J. Probable causes of increasing brucellosis in free-ranging elk of the Greater Yellowstone Ecosystem. **Ecol Appl**. 2010 Jan;20(1):278-88. doi: 10.1890/08-2062.1. PMID: 20349847.

DADAR, M.; SHAHALI, Y.; FAKHRI, Y.; GODFROID, J. The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis. **Transbound Emerg Dis**. 2021 Mar;68(2):715-729. doi: 10.1111/tbed.13735. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32679611

DAHOUK, S. A. L.; SPRAGUE L.D.; NEUBAUER, H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. **Rev Sci Tech**. 2013 Apr;32(1):177-88. doi: 10.20506/rst.32.1.2204. PMID: 23837375 DOI: 10.20506/rst.32.1.2204

- DAHROUG M.A., ALMEIDA A.B., SOUSA V.R., DUTRA V., TURBINO N.C., NAKAZATO L. DE SOUZA R.L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2010. 104:73-74. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.08.003
- DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; GUIMARÃES, L. D.; SOARES, C. E.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. The first case report of *Leishmania (leishmania) chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** 2011 Jun;1(3):249-50. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60036-1. PMID: 23569768; PMCID: PMC3609183.
- DIAS, A. F. L. R.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. Molecular detection of visceral leishmaniasis in dogs from Barão de Melgaço, Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 2021, 41:e06485. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-6485.
- DIAS, A. F. L. R.; ALMEIDA, A. B. P. F.; RODRIGUES, J. Y.; NAKAZATO, L.; FUJIMORI, M.; SOUSA, V. R. F. Cytological and molecular detection of *Leishmania* spp. in different biological tissues of dogs in areas endemic for visceral leishmaniasis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2019 Nov-Dec 71(6):2103-2106. doi: 10.1590/1678-4162-10775.
- DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *Journal Parasitology.* 1995 Jun;81(3):410-5. PMID: 7776126.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology.** 2004 Dec 9;126(1-2):57-72. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.005. PMID: 15567579.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years. **Veterinary Parasitology.** 2009 Jul 7;163(1-2):1-14. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.026. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19395175.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology.** 2008 Sep;38(11):1257-78. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.007. Epub 2008 Apr 11. PMID: 18508057.
- ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol.** 2010 Apr;26(4):190-6. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.009. Epub 2010 Mar 2. PMID: 20202907.
- FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T. M.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 2008 Feb;102(2):200-1. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.10.001. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18036627.
- FUNK S.M., FIORELLO C.V., CLEAVELAND S. GOMPPER M.E. The role of disease in carnivore ecology and conservation, 2001. p.442-466.
- FURTADO, M.M.; GENNARI, S.M.; IKUTA, C.Y.; JÁCOMO, A.T.; DE MORAIS, Z.M.; PENA, H.F.; PORFÍRIO, G.E.; SILVEIRA, L.; SOLLMANN, R.; DE SOUZA, G.O.; TÔRRES, N.M.; FERREIRA NETO, J.S. Serosurvey of Smooth *Brucella*, *Leptospira* spp.

and *Toxoplasma gondii* in Free-Ranging Jaguars (*Panthera onca*) and Domestic Animals from **Brazil**. **PLoS One**. 2015 Nov 25;10(11):e0143816. doi: 10.1371/journal.pone.0143816. PMID: 26605787; PMCID: PMC4659634.

GARCIA, J. L. NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVIERA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundo de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil, **Ciência Rural**, v. 29, p. 91-97, abr. 1999.

GODFROID J. Brucellosis in Livestock and Wildlife: Zoonotic Diseases Without Pandemic Potential In Need of Innovative Health Approaches. *Arch Public Health*. 2017;75 (34).

HATAM-NAHAVANDI, K.; CALERO-BERNAL, R.; RAHIMI, M. T.; PAGHEH, A. S.; ZAREAN, M.; DEZHAKAM, A.; AHMADPOUR, E. *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis *International Journal of Scientific Reports*. 2021 May 4;11(1):9509. doi: 10.1038/s41598-021-89031-8. PMID: 33947922; PMCID: PMC8097069.

HERRMANN, D. C.; WIBBELT, G.; GÖTZ, M.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers (*Castor fiber*) and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). **Veterinary Parasitology**. 2013 Jan 16;191(1-2):108-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.08.026. Epub 2012 Sep 4. PMID: 22989954.

HILL D.; DUBEY J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**. Volume 8, Issue 10, October 2002, Pages 634-640. doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x

HOFF, G.L.; BIGLER, W.J.; TRAINER, D.O.; DEBBIE, J.G.; BROWN, G.M.; WINKLER, W.G.; RICHARDS, S.H.; REARDON, M. Survey of selected carnivore and opossum serums for agglutinins to *Brucella canis*. **J Am Vet Med Assoc**. 1974 Nov 1;165(9):830-1. PMID: 4426867.

HOQ, A. A serologic survey of *Brucella* agglutinins in wildlife and sheep. **Calif Vet**. (1978) 32:15–17.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Brasileira [online]. Rio de Janeiro: IBGE; 2019. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html?&t=resultados>

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBIO). Febre amarela: macacos não transmite a doença. 2018. <https://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/9416-febre-amarela-macacos-nao-transmitem-a-doenca>. Acesso em 18 de outubro de 2021.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO (INDEA). Pecuária de MT quebra novo recorde e rebanho atinge 32,7 milhões de cabeças. 2022. <http://www.indea.mt.gov.br/-/18851655-pecuaria-de-mt-quebra-novo-recorde-e-rebanho-atinge-32-7-milhoes-de-cabecas>

- JAFARI-MODREK, M.; HASANZADEH, R.; AZIZI, H.; HATAM-NAHAVANDI, K. A Seroprevalence Study of Toxoplasmosis in Female Students in Zahedan, South East of Iran. **Iran J Public Health**. 2019 May;48(5):988-990. PMID: 31523662; PMCID: PMC6717418.
- JONES, C. D.; OKHRAVI, N.; ADAMSON, P.; TASKER, S.; LIGHTMAN, S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000 Mar;41(3):634-44. PMID: 10711675.
- JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. **Global trends in emerging infectious diseases**. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):990-3. doi: 10.1038/nature06536. PMID: 18288193; PMCID: PMC5960580.
- KOSOY, M.; GOODRICH, I. Comparative Ecology of Bartonella and Brucella Infections in Wild Carnivores. **Frontiers in veterinary Science**. 2019 5: 322. doi: 10.3389/fvets.2018.00322
- LAWINSKY, M.L.J.; OHARA, P.M.; ELKHOURY, M.R.; FARIA, N.C.; CAVALCANTE, K.R.L.J. Estado da arte da brucelose em humanos. **Rev Pan-Amaz Saude**;1(4):75- 84, 2010. DOI: 10.5123/S2176-62232010000400012.
- LONGONI SS, LÓPEZ-CEPESDES A, SÁNCHEZ-MORENO M, BOLIO-GONZALEZ ME, SAURI-ARCEO CH, RODRÍGUEZ-VIVAS RL., CLOTILDE MARÍN. Detection of different *Leishmania spp* and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2012;35(5):469-76. doi: 10.1016/j.cimid.2012.04.003
- LUPPI, M. M.; MALTA, M. C.; SILVA, T. M.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Wildlife Medicine • Pesq. Vet. Bras**. 34 (12) • Dec 2014 • <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200017>
- MADRUGA G, RIBEIRO AP, RUIZ T, SOUSA VRF, CAMPOS CG, ALMEIDA ABPF. Ocular manifestations of leishmaniasis in a cat: first case report from Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2018; 70(5): 1514-1520. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9244>.
- MASON, S.; QUINNELL, J. R.; SMITH, J. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. **Veterinary Parasitology**. 2010 May 11;169(3-4):258-63. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.021. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20144507.
- MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; LOPES, K. S. P. D. P.; MAGALHÃES NETO, F. D. C. R.; ALCÂNTARA, D. S.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; COSTA, C. H. N. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**. 2020 Apr;280:109058. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109058. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32200198.
- MISHRA C, SAMELIUS G, KHANYARI M, SRINIVAS PN, LOW M, ESSON C, VENKATACHALAM S, JOHANSSON Ö. Increasing risks for emerging infectious diseases within a rapidly changing High Asia. **Ambio**. 2022 Mar;51(3):494-507. doi: 10.1007/s13280-021-01599-7. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34292521; PMCID:

- MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; HAMZAVI, Y.; MOBEDI, I.; ARSHI, S.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; NAEINI, K. M.; AVIZEH, R.; FAKHAR, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. **Veterinary Parasitology**. 2005 May 15;129(3-4):243-51. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.01.010. PMID: 15845279.
- MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M. I.; CRUZ, I.; IRISO, A.; MARTÍN-MARTÍN, I.; SEVILLANO, O.; MELERO, S.; BERNAL, J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary Parasitology**. 2012 Nov 23;190(1-2):268-71. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.006. Epub 2012 May 23. PMID: 22677135.
- MORENO E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. **Front Microbiol**. (2014) 5:213. doi: 10.3389/fmicb.2014.00213
- NASCIMENTO, L. F. J.; CIRILO, T. M.; GOMES, D. S.; GOMES, A. C. A.; LIMA, V. F. S.; SCHER, R.; JAIN, S.; FUJIWARA, R. T.; DOLABELLA, S. S. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology Research**. 2021 Nov 11:1–14. doi: 10.1007/s00436-021-07372-9. Epub ahead of print. PMID: 34761278; PMCID: PMC8580739.
- NOWELL K, JACKSON P. North Africa and Southwest Asia, Cheetah. In: Nowell K, Jackson P, Wild cats: Status survey and conservation action plan. Gland, Switzerland: IUCN/SSC Cat Specialist Group. 1996. 41-44.
- OLIVEIRA-FILHO, E.F.; PINHEIRO JR, J.W.; SOUZA, M.M.A.; SANTANA, V.L.A.; SILVA, J.C.R.; MOTA, R.A.; SÁ, F.B. Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 2012, 43(2):384-387. doi: 10.1638/2009-0260.1
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Leishmaniasis; Organização Mundial de Saúde: Geneva, Switzerland, 2022. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
- PASSOS, V. M., LASMAR, E. B.; GONTIJO, C. M.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1996 Jan-Feb;91(1):19-20. doi: 10.1590/s0074-02761996000100003. PMID: 8734945.
- PAULIN, L. M.; FERREIRA, J. S., Combate à Brucelose Bovina. Situação Brasileira. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154 p.
- PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog. **Veterinary Parasitology**. 2018 Feb 15;251:131-137. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.01.012. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29426470; PMCID: PMC7130840.
- PEREIRA, A.F.E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LIMA, C.H.; THOMAZ-SOCCOL, A.; CASTRO, A.E.; MULINARI-BRENNER, F.; QUEIROZ-TELLES, F.; LUZ, E. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1024-1030, 2008.

PEREIRA, M. F.; PEIXOTO, R. M.; LANGONI, H.; GRECA, H. JUNIOR.; AZEVEDO, S. S.; PORTO, W. J. N.; MEDEIROS, E. S.; MOTA R. A. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2012 Fev 32(2): 140-146.

REIS, L. L.; BALIEIRO, A. A. S.; FONSECA, F. R.; GONÇALVES, M. J. F. Visceral leishmaniasis and its relationship with climate and environmental factors in the State of Tocantins, Brazil, from 2007 to 2014. **Reports in Public Health**. 2019 Jan; 35(1): e00047018. doi: 10.1590/0102-311X00047018.

ROMERO GA, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010 Jan 19;4(1):e584. doi: 10.1371/journal.pntd.0000584. PMID: 20098726; PMCID: PMC2808217

ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. 2014 Aug 29;3(3):251-62. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004. PMID: 25426421; PMCID: PMC4241529.

ROSYPAL, A. C.; TRIPP, S.; LEWIS, S.; FRANCIS, J.; STOSKOPF, M. K.; LARSEN, R. S.; LINDSAY, D. S. Survey of antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* in gray and red fox populations from North Carolina and Virginia. **Journal Parasitology**. 2010 Dec;96(6):1230-1. doi: 10.1645/GE-2600.1. Epub 2010 Aug 13. PMID: 21158642.

ROSS, R. Note on the bodies recently by *Leishman na Donovan* futher notes no leishmn's bodies. **British Medical Journal**. 1906. v.2, p.1261-1401.

SACHS, R.; STAAK, C.; GROOCOCK, C.M. Serological investigation of brucellosis in game animals in Tanania. **Bull Epizoot Dis Afr**. 1968 Mar;16(1):93-100. PMID: 5693879.

SAFARPOUR, H.; CEVIK, M.; ZAREAN, M.; BARAC, A.; HATAM-NAHAVANDI, K.; RAHIMI, M. T.; BANNAZADEH BAGHI, H.; KOSHKI, T. J.; PAGHEH, A. S.; SHAHRIVAR, F.; EBRAHIMI, M.; AHMADPOUR, E. Global status of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in people living with HIV. **AIDS**. 2020 Mar 1;34(3):469-474. doi: 10.1097/QAD.0000000000002424. PMID: 31714356.

SAMBROOK J, RUSSEL DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004.

SANTIAGO, M. E.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; MUNARI, D. P.; MICHELIN ADE, F.; LIMA, V. M. An investigation of *Leishmania spp.* in *Didelphis spp.* from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**. 2007 Dec 25;150(4):283-90. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.09.026. Epub 2007 Nov 8. PMID: 17996372.

SANTOS, R.; CAMPOS, P.C.; RUNGUE, M.; ROCHA, V.; SANTOS, D.; MENDES, V.; MARINHO, F.V.; MARTINS, F.; RICCI, M.F.; REIS, D.C.D.; CASSALI, G.D.; ALVES-FILHO, J.C.; VIEIRA, A.T.; OLIVEIRA, S.C. The Role of ST2 Receptor in the Regulation of *Brucella abortus* Oral Infection. **Pathogens**. 2020 Apr 28;9(5):328. doi: 10.3390/pathogens9050328. PMID: 32353980; PMCID: PMC7281115.

- SAVANI, E. S.; DE ALMEIDA, M. F.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; D'AURIA, S. R.; SILVA, M. M.; DE OLIVEIRA, M. L.; SACRAMENTO, D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology*. 2010 Feb 26;168(1-2):5-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.10.019. Epub 2009 Oct 31. PMID: 19939568.
- SCHOLZ, H.C.; VERGNAUD, G. Molecular characterisation of Brucella species. **Rev Sci Tech**. 2013 Apr;32(1):149-62. doi: 10.20506/rst.32.1.2189. PMID: 23837373.
- SILVA RBS, PORTELA RA, ARRUDA LFB, FERREIRA JS, SOUTO EPF, ARAÚJO AL, et al. Natural Infection by *Leishmania infantum* in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Braz J Vet Parasitol** 2020; 29(4): e016620. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020102>
- SOARES, C. S.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What do we know about feline leishmaniasis? **J Feline Med Surg**. 2016 Jun;18(6):435-42. doi: 10.1177/1098612X15589358. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26116620.
- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19559536.
- SOUZA, A. I.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Vet Parasitol**. 2005 Mar 10;128(1-2):41-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.11.020. Epub 2004 Dec 25. PMID: 15725531.
- SOUZA, T. D.; TURCHETTI, A. P.; FUJIWARA, R. T.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Vet Parasitol**. 2014 Mar 1;200(3-4):233-41. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.12.025. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24439771.
- SOUZA, W., BELFORT JR., R., comp. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2014, 214 p. ISBN: 978-85-7541-571-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415719>.
- SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; RIBEIRO, L. C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A. P.; CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras MED TROP**, V. 36, N. 4, P. 483-491, AGO. 2003.
- TOLENTINO, N.; PINHEIRO, G. R. G.; OTTINO, J.; OLIVEIRA, A. R.; COELHO, C. M.; TINOCO, H. P.; FUJIWARA, R. T.; SANTOS, R. L.; RIBEIRO, V. M. Serological evidence of *Leishmania* infection by employing ELISA and rapid tests in captive felids and canids in **Brazil**. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, 100308, 2019.
- TURČEKOVÁ, Ľ.; HURNÍKOVÁ, Z.; SPIŠÁK, F.; MITERPÁKOVÁ, M.; CHOVANCOVÁ, B. *Toxoplasma gondii* in protected wildlife in the Tatra National Park (TANAP), Slovakia. **Annals of agricultural and environmental medicine**. 2014;21(2):235-8. doi: 10.5604/1232-1966.1108582. PMID: 24959767

- ULLMANN, L. S.; DA SILVA, R. C.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; DOS SANTOS, L. C.; HOFFMANN, J. L.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A. M.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology** 2010 Aug 27;172(1-2):144-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.013. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20472340.
- VANWORMER, E.; MILLER, M. A.; CONRAD, P. A.; GRIGG, M. E.; REJMANEK, D.; CARPENTER, T. E.; MAZET, J. A. Using molecular epidemiology to track *Toxoplasma gondii* from terrestrial carnivores to marine hosts: implications for public health and conservation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2014 May 29;8(5):e2852. doi: 10.1371/journal.pntd.0002852. PMID: 24874796; PMCID: PMC4038486.
- VELARDE, F. I.; MONTENEGRO, Y. V.; CANTO, Y. A. Parasitología Veterinaria - Protozoários. Ed Castdel, 2009, v. 1, p.174.
- VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H.; SANTOS, A. L.; WERTHER, K.; MARVULO, M. F.; SIQUEIRA, D. B.; PENA, H. F.; SOARES, R. M.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. 2014 Oct 13;3(3):276-83. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.09.003. PMID: 25426424; PMCID: PMC4241539.
- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**. 2009 Jul 1;39(8):895-901. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.004. Epub 2009 Feb 13. PMID: 19217908; PMCID: PMC2704023.
- WITTER, R.; PENA, H. F. J.; MAIA, M. O.; DE MAGALHÃES, A. O.; MORGADO, T. O.; COLODEL, E. M.; BARROS, D. A.; IGARASHI, M.; GENNARI, S. M.; PACHECO, R. C. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in the Midwestern Brazil revealed high genetic diversity and new genotypes. **Acta Tropica**. 2020 Dec;212:105681. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105681. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32926845
- YON L, DUFF J P, ÅGREN EO, ERDÉLYI K, FERROGLIO E, GODFROID J, HARS J, HESTVIK G, HORTON D, KUIKEN T, LAVAZZA A, MARKOWSKA-DANIEL I, MARTEL A, NEIMANIS A, PASMANS F, PRICE SJ, RUIZ-FONS F, RYSER-DEGIORGIS MP, WIDÉN F, GAVIER-WIDÉN D. Recent changes in infectious diseases in european wildlife. **Journal of wildlife diseases**. 2019;55(1):3–43. doi: 10.7589/2017-07-172
- ZARNKE, R. L.; DUBEY, J. P.; VER HOEF, J. M.; MCNAY, M. E.; KWOK, O. C. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**. 2001 Jan;37(1):36-8. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.36. PMID: 11272502.
- ZARZA, H.; ARIAS-ALZATE, A.; GONZÁLEZ-MAYA, J. F.; CHÁVEZ, C.; CEBALLOS, G. First record of Leishmaniasis in wild Jaguars (*Panthera onca*) from Mexico. **Mammalogy Notes**. 2015; 2:11-12. doi: 10.47603 / manovol2n1.11-12.

APÊNDICE A

Revista: The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Molecular detection of *Brucella abortus* in wild and captive felids

Francielle Cristina Kagueyama^{1*}, Fernanda Harumi Maruyama¹, Leticia Camara Pitchenin¹, Valéria Dutra¹, Luciano Nakazato¹.

¹Postgraduate Program in Veterinary Sciences (PPGVET), Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa s / n, Coxipó, Cuiabá, MT 78068-900, Brazil.

*Corresponding author: franciellekagueyama@hotmail.com

ABSTRACT

Purpose:

Brucellosis is a zoonotic disease of great public health importance. In wild animals, *Brucella abortus* is one of the most diagnosed species, mainly in enzootic environments where domestic animals share the same environment. *B. abortus* is common in environments shared by cattle, wild, and domestic animals. This study aimed to detect the presence of *B. abortus* DNA in free-ranging and captivity felids at Mato Grosso State, Brazil

Method:

Polymerase chain reaction, based on the genetic element IS711, were performed in blood samples collected from 23 free-ranging and captive felids. The species represented include *Leopardus colocolo*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Panthera onca*, *Puma concolor*, and *Puma yagouaroundi*.

Results:

DNA amplification of *B. abortus* was observed in only one captive *P. concolor* (4.34%).

Conclusion:

The detection of this pathogen in captive animals using molecular support tools demonstrates the importance of monitoring, as it raises concerns about the possibility of transmission between humans and wild and domestic animals, especially in regions of vast biodiversity, such as in the State of Mato Grosso, Brazil.

Keywords: PCR; *Brucella* spp; *Felidae*;

Zoonotic diseases contribute to 60% of the emerging infectious diseases, and 71.8% of these originate from wildlife. Among pathogens, *Brucella* spp. have great zoonotic potential, with more than 500,000 new cases emerging each year 1.

In wild animals, *B. abortus* is one of the most diagnosed species, especially in enzootic regions where domestic animals share the same environment 2. The presence of infectious pathogens in wild populations contributes to the spread of diseases, decline in species population and persistence in reservoir hosts 3.

In recent years, One Health issue has been addressed for the control, eradication, and prevention of brucellosis at the wildlife, livestock, and human interface, considering the complex eco-epidemiological aspects of this zoonosis 4. Thus, considering the importance of wild felids in the maintenance of the functional ecosystem. This study aimed to detect the presence of *B. abortus* DNA in blood samples **from free-ranging and captivity** wild felids at Mato Grosso State, Brazil.

Whole blood samples (1 mL) were collected from 23 wild felids between August 2014 and August 2018 in the state of Mato Grosso, Brazil. The animals, ten from captivity and thirteen wilds, were rescued by environmental government agencies and admitted for rehabilitation at the Medical Clinic of Wild Animals, Veterinary Hospital, Federal University of Mato Grosso. Animal handling and sample collection were carried out in accordance with the “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO) n° 40617-1 e 42303.

Genomic DNA extraction from the samples was performed using 250 µL of whole blood plus 1 µL of lysis buffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% SDS, and 0.1 mg proteinase K), which was incubated at 56°C overnight, and subsequently treated with phenol-chloroform 5. The DNA was resuspended in 50 µL ultrapure water and stored at -20°C until use.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed, based on the IS711 genetic element from *Brucella abortus*, using the following primers: forward 5'-GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC-3' and reverse 5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TGC CAG-3' 6, which amplified a fragment of 500 bp. Each reaction consisted of 10 ng of DNA, 0.4 pmol of each primer (forward and reverse), 0.2 nM of dNTPs, 3 mM of MgCl₂, 1x PCR buffer, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), and ultrapure water for obtaining a final volume of 25 µL. The amplification protocol was as follows: initial denaturation for 5 min at 94°C, 35 cycles of denaturation for 15 s at 94°C, hybridization for 45 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C, followed by a final extension cycle at 72°C for 5 min. PCR products were stained with GelRed (Biotium), separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel (10 V/cm), and visualized on a transilluminator.

Out of the total sample tested, one (4.34%) captive *P. concolor* was positive for *B. abortus* (Table 1). A likely source of infection in felines raised in captivity is their diet, which is mostly composed of viscera and fetuse from bovine slaughterhouses.

Little is known about the prevalence of *Brucella* spp. in wild cats. Reports of *Brucella* spp. in populations of felids detected using PCR are rare. However detected *B. abortus* via PCR in *P. onca* and *L. pardalis*, and *B. canis* in *P. concolor* captive animals 7.

Some species, such as *Panthera leo* from Tanzania, *P. onca* and *P. concolor* from Brazil, and *Lynx rufus* from the United States were positive to DNA or antibodies against *Brucella abortus* 8 – 9 – 7 - 10. Antibodies against *B. canis* were detected in *L. rufus* from the United States, and in *P. concolor* and *L. pardalis* from Brazil

detected a free-living *Panthera onca* in the Cerrado-biome that was seropositive for *Brucella* spp. 7-10.

Brucellosis occurs when contact is made between the agent and the respiratory tract, skin lesions, and/or gastrointestinal tract 12. In the wild, *B. abortus* infections in wild cats are generally associated with predation of infected cattle 11.

Bovine brucellosis in Mato Grosso is associated with beef cattle and is the most frequent infection in animals that share the same habitat with cattle, domestic, and wild animals 13. In captivity, a possible source of infection in zoo animals may be associated with the ingestion of contaminated meat and water 14.

Another risk factor for transmission could be close contact with domestic animals like stray cats, once these animals can access captive animal enclosures and infect these animals as well as the environment 2.

The five specimens studied were at extremely high risk of becoming extinct in the wild: *L. colocolo*, *L. wiedii*, *P. onca*, *P. concolor*, and *P. yagouaroundi*. It is noteworthy that *P. concolor* is listed as threatened with extinction in Brazil and is considered a vulnerable species 15. The impact of wildlife *Brucella* infections on the emergence of brucellosis in animals and humans is difficult to measure, as bacterial transmission is rarely described and poorly understood 16.

The present study showed that *B. abortus* circulates in wild felines in the state of Mato Grosso. These animals can play an important role in ecological function, as carriers of emerging infectious pathogens and indicators of environmental health, even without the development of clinical disease. The detection of this pathogen in captive animals using molecular tools demonstrated the importance of monitoring, as it raises concerns about the possibility of transmission between humans and wild and domestic animals, especially in regions of vast biodiversity and ecological interest, such as the state of Mato Grosso.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES for financial support through a scholarship.

Disclaimers

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

References

1. Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3. doi: 10.1038/nature06536
2. Wareth G., Melzer F, El-Diasty M, *et al.* Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms. *Transboundary and emerging diseases*. 2017;64(5):27–30. doi: 10.1111/tbed.12535
3. Yon L, Duff J.P., Ågren E.O., *et al.* Recent changes in infectious diseases in european wildlife. *Journal of wildlife diseases*. 2019;55(1):3–43. doi: 10.7589/2017-07-172
4. Godfroid J. Brucellosis in Livestock and Wildlife: Zoonotic Diseases Without Pandemic Potential in Need of Innovative Health Approaches. *Arch Public Health*. 2017;75 (34). doi: 10.1186/s13690-017-0207-7
5. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004.
6. Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(11):2660–2666. doi: 10.1128/jcm.32.11.2660-2666.1994.
7. Almeida A.B.P.F., Silva C.P.A., Pitchenin L.C., *et al.* *Brucella abortus* and *Brucella canis* in captive wild felids in Brazil. *International Zoo Yearbook*. 2013; 47(1):204–207. doi: 10.1111/j.1748-1090.2012.00188.x
8. Sachs R., Staak C., Grocock C.M. Serological investigation of brucellosis in game animals in Tanzania. *Bull Epizoot Dis Afr*. 1968; 16:93–100.
9. Hoq A. A serologic survey of *Brucella* agglutinins in wildlife and sheep. *Calif Vet*. 1978 32:15–17.
10. Furtado M.M., Gennari S.M., Ikuta C.Y. *et al.* Serosurvey of Smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in Free-Ranging Jaguars (*Panthera onca*) and Domestic Animals from Brazil. *PloS one*. 2015;10(11)
11. Barddal J.H.I, Quixbeira-Santos J.C., Lopes I.F., *et al.* Effect of vaccination in lowering the prevalence of bovine brucellosis in the state of Mato Grosso. *Brazil Semina*. 2016; 37:3479–3492. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3479
12. Amjadi O., Rafiei A., Mardani M., Zafari P., Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infectious Diseases*. 2019;51(5):321–333. doi: 10.1080/23744235.2019.1568545
13. de Oliveira A., de Macedo G.C., Rosinha G., *et al.* Detection of *Brucella* spp. in dogs at Pantanal wetlands. *Brazilian journal of microbiology*. 2019; 50(1):307–312. doi: 10.1007/s42770-018-0006-5

14. Oliveira-Filho E.F., Júnior J.W.P., Souza M.M.A., *et al.* Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2012;43(2):384–387. doi: 10.1638/2009-0260.1
15. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. ICMBio. 2018;4162p.
16. Dadar M., Shahali Y., Fakhri Y., Godfroid J. The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis. *Transboundary and emerging diseases*. 2021; 68(2):715–729. doi: 10.1111/tbed.13735

Tabela 1. Molecular detection by polymerase chain reaction (*PCR*) of *Brucella abortus* in the blood of wild free-living and captive felids from the state of Mato Grosso, Brazil, during 2014-2018

Species (n)	Habitat	Municipality	<i>Brucella abortus</i>
<i>Leopardus colocolo</i>	free-living	Várzea Grande	0
<i>Leopardus pardalis</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Leopardus pardalis</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Leopardus pardalis</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Leopardus pardalis</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Leopardus pardalis</i>	free-living	Várzea Grande	0
<i>Leopardus pardalis</i>	free-living	Barra do Bugres	0
<i>Leopardus pardalis</i>	free-living	Barra do Bugres	0
<i>Leopardus pardalis</i>	free-living	Várzea Grande	0
<i>Leopardus wiedii</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Panthera onca</i>	free-living	Marcelândia	0
<i>Panthera onca</i>	free-living	NF	0
<i>Panthera onca</i>	captive	Cuiabá	0
<i>Puma concolor</i>	free-living	Acorizal	0
<i>Puma concolor</i>	free-living	Tangará da Serra	0
<i>Puma concolor</i>	free-living	Cáceres	0
<i>Puma concolor</i>	free-living	Pontes e Lacerda	0
<i>Puma concolor</i>	Captive	Cuiabá	1 (4,34%)
<i>Puma concolor</i>	Captive	Cuiabá	0
<i>Puma concolor</i>	Captive	Cuiabá	0
<i>Puma concolor</i>	Captive	Cuiabá	0
<i>Puma yagouaroundi</i>	free-living	NF	0

NF- Não informado

APENDICE B

Revista: Research, Society and Development

Bronchopneumonia in sheep associated with *Providencia stuartii*

Broncopneumonia em ovinos associada a *Providencia stuartii*

Bronconeumonía en ovinos asociada a *Providencia stuartii*

Received: 01/00/2021 | Reviewed: 02/00/2021 | Accept: 02/00/2021 | Published: 04/10/2021

Francielle Cristina Kagueyama

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9760-3400>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: franciellekagueyama@hotmail.com

Fernanda Harumi Maruyama

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1847-7574>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: fer_19_nanda@hotmail.com

Edson Moleta Colodel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7866-3125>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: moleta@gmail.com

Lucas Avelino Dandolini Pavelegini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9241-6641>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: lucasavelinodandolini@gmail.com

Luciano Nakazato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1244-0690>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: lucnaka@gmail.com

Valéria Dutra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6630-2293>

Federal University of Mato Grosso, Brazil

E-mail: valeriadutra.dutra@gmail.com

Abstract

Bacteria of the genus *Providencia* are opportunistic pathogens in humans, widely distributed in the environment and associated with greater resistance to antibiotics, and this being uncommon the association with clinical diseases. Bacteria of the genus *Providencia* are opportunistic pathogens in humans, being associated with higher antibiotic resistance, and their association with clinical diseases are uncommon. This study reports the isolation of *P. stuartii* in two sheep that presented clinical signs of pneumonia. At necropsy there was severe and acute fibrinopurulent bronchopneumonia. Histologically, there were infiltrated neutrophils and fibrin in the alveolar lumen, and the alveolar septa presented multifocal thickening with moderate proliferation of pneumocytes and mononuclear interstitial infiltrate. *Providencia* spp. was isolated in the microbiological tests of the lung and tracheal secretions. The isolate was subjected to DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) for the 16SrRNA gene and sequencing of genomic DNA, which demonstrated 100% homology with *P. stuartii*. This is the first report of the presence of this microorganism as a cause of interstitial and fibrinopurulent bronchopneumonia in sheep. Therefore, it is suggested that epidemiological surveillance strategies should be carried out in animals to better understand their role in the dissemination of this pathogen.

Keywords: Microbiology, Pathology, Pneumonia, Sequencing, Sheep.

Resumo

Bactérias do gênero *providencia* são patógenos oportunistas em humanos, amplamente distribuídas no ambiente e estão associadas a maior resistência aos antibióticos, sendo incomum a associação com doenças clínicas. Este estudo relata o isolamento de *P. stuartii* em duas ovelhas que apresentaram sinais

clínicos de pneumonia. Na necropsia havia broncopneumonia fibrinopurulenta aguda e grave. Histologicamente, havia neutrófilos infiltrados e fibrina na luz alveolar, e os septos alveolares apresentavam espessamento multifocal com proliferação moderada de pneumócitos e infiltrado intersticial mononuclear. *Providencia* spp. foi isolado nos exames microbiológicos do pulmão e secreções traqueais. O isolado foi submetido à extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene 16SrRNA e sequenciamento do DNA genômico, que demonstrou 100% de homologia com *P. stuartii*. Este é o primeiro relato da presença desse microrganismo como causa de broncopneumonia intersticial e fibrinopurulenta em ovinos. Portanto, sugere-se que estratégias de vigilância epidemiológica devam ser realizadas em animais para melhor compreensão de seu papel na disseminação desse patógeno.

Palavras-chave: Microbiologia, Patologia, Pneumonia, Sequenciamento, Ovinos.

Resumen

Las bacterias del género *Providencia* son patógenos oportunistas en el ser humano, ampliamente distribuidos en el medio ambiente y asociados a una mayor resistencia a los antibióticos, siendo infrecuente la asociación con enfermedades clínicas. Este estudio reporta el aislamiento de *P. stuartii* en dos ovejas que presentaban signos clínicos de neumonía. En la necropsia había bronconeumonía fibrinopurulenta aguda y grave. Histológicamente había neutrófilos infiltrados y fibrina en la luz alveolar, y los septos alveolares presentaban engrosamiento multifocal con moderada proliferación de neumocitos e infiltrado intersticial mononuclear. *Providencia* spp. se aisló en las pruebas microbiológicas de las secreciones pulmonares y traqueales. El aislado se sometió a extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen 16SrRNA y secuenciación del ADN genómico, que demostró una homología del 100% con *P. stuartii*. Este es el primer reporte de la presencia de este microorganismo como causa de bronconeumonía intersticial y fibrinopurulenta en ovinos. Por tanto, se sugiere que se lleven a cabo estrategias de vigilancia epidemiológica en animales para comprender mejor su papel en la diseminación de este patógeno.

Palabras clave: Microbiología, Patología, Neumonía, Secuenciación, Ovino.

1. Introduction

The genus *Providencia* comprises gram-negative rods that include ten species: *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. stuartii*, *P. vermicola*, *P. sneebia*, *P. burhodogranariae*, *P. thailandensis* (Juneja & Lazzaro, 2009; Muller et al., 1986; Somvanshi et al., 2006) and the new species *P. entomophila* (Ksentini et al., 2019). Unlike other members of the Enterobacteriaceae family, they are characterized by the ability to oxidatively deaminate to the corresponding keto acid and ammonia (Farmer et al., 1985).

Widely distributed in the environment, species of *Providencia* are important opportunistic pathogens in humans, being associated with higher antibiotic resistance (Wie, 2015). Research related to resistance genes and their environmental dissemination show their importance in public health (Iwata et al., 2020), mainly due to the growth of intrinsic resistance to antibiotics that are considered last-resort treatments and the gene acquisition that code for different enzymes (Liu et al., 2020; Tavares et al., 2015). *Providencia stuartii* is present in the environment, including water and soil, and is also responsible for nosocomial infections (Liakopoulos et al., 2017). In humans, this bacterium has been isolated mainly from patients with chronic urinary tract diseases who are subjected to prolonged use of catheters (Barl et al., 2012; Wie, 2015). However, reports of the presence of renal and hepatic abscesses (Chamberland et al., 2013; Lin et al., 2017), meningitis (Sipahi et al., 2010), endocarditis (Krake & Tandon, 2004), conjunctivitis (Crane et al., 2016) and septic vasculitis (George et al., 2020) have also been described in the literature.

Descriptions in animals are scarce in the literature, being associated with primate sepsis, ulcerative dermatitis and cellulitis in canine and diarrheal swine feces (Almeida et al., 2007; Liu et al., 2016; Papadogiannakis et al., 2007). In addition, *Providencia* spp. were found in retail meats in China and Japan (Di et al., 2018) and Barbour et al (2012) isolated of liver from broiler chicken in Lebanon, which could cause a serious public health

problem

Therefore, this report describes the pathological findings, microbiological and molecular analyses of *P. stuartii* present in the lung of sheep with bronchopneumonia, highlighting that animals may be important sources of transmission to humans, in addition to enabling the spread of *Providencia* spp. in food.

2. Methodology

A batch of 150 sheep was purchased and introduced to a property in the municipality of Santo Antônio de Leverger -MT. Within 3 months, some animals showed clinical signs of difficulty breathing and coughing. Of these, two young male sheep, weighing 15 kg and 17.3 kg, presented slightly pale oral and ocular mucosa, evolving to death.

A fragment of the lung and a sample of the tracheal secretion were sent for bacteriological isolation to the Laboratory of Microbiology (HOVET-UFMT), seeded in 8% Sheep Blood Agar, MacConkey Agar and Sabourad Agar, incubated in aerobic conditions at 37°C for up to 7 days, and after growth, colony identification was performed according to Quinn et al. (2011).

For molecular characterization, the isolate was inoculated in Brain Heart Infusion Broth (BHI) and incubated at 37°C *overnight*. After centrifugation, the precipitate was resuspended in 1 mL lysis buffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1mg Proteinase K) and DNA was extracted using the phenol-chloroform method, according to Sambrook and Russell (2004). The DNA was resuspended with 50 µL of ultrapure water. To verify the integrity and quality of the extract, the DNA was stained with Gel Red (Biotium), subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis at 100 V for 40 min, and visualized on ChemiDoc™ XRS using ImageLab™ software.

PCR was performed to sequence the 16S rRNA, using the oligonucleotide pairs 27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (Lane, 1991) and 1492R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (Turner et al., 1999), amplifying products of 1424 bp. The reaction was performed with 10 ng genomic DNA, 0.4 pmol oligonucleotides, 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1x PCR buffer 10x (200 mM Tris-HCL pH 8.4 and 500 mM KCl), 1 U of Taq DNA polymerase (*Invitrogen*) and ultrapure water q.s.p. to a final volume of 25 µL. The reactions were amplified in a My Cycler™ thermocycler (Biorad), with an initial denaturation of 5 minutes at 95°C, followed by 35 denaturation cycles for 45 seconds at 95°C, hybridization for 1 minute at 52°C and 1 minute and 30 seconds at 72°C extension and a final extension cycle at 72°C for 7 minutes.

Amplification products, stained with Gel Red (Biotium), were subjected to 1.0% agarose gel electrophoresis at 100 V for 90 min, visualized on ChemiDoc™ XRS using ImageLab™ software, and purified using Illustra™ ExoProstar™ enzyme, following the manufacturer's instructions. Subsequently, sequencing was performed using an ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, USA).

3. Results

After referral for necropsy, two samples were collected from the sheep for histopathological and microbiological analysis. In the post-mortem examination, the presence of yellowish mucous material was observed in most of the bronchial tree, obliterating the bronchial lumen. The pleural surface contained random reddish multifocal areas (“marbled pattern”), affecting 60% of the organ, with consolidation and the presence of

fibrin.

Histological changes were similar in both animals, with thickened alveolar septa, associated with moderate proliferation of pneumocytes and mononuclear interstitial infiltrate. In the bronchiolar and alveolar lumen, there was a variable neutrophil infiltration associated with fibrin aggregates and cellular debris, in addition to the occasional necrosis of the alveolar septa and the rare presence of syncytial cells, lymphocytes and plasma cells. Occasionally there were fibrin thrombi in the vascular lumen.

In the two lung samples, bacteria with phenotypic characteristics similar to *P. stuartii* were identified. The sequences obtained were compared and deposited into the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) on the NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and the result demonstrated 100% identity with *P. stuartii*. The sequences were deposited at GenBank under the number MN733989.

4. Discussion

Respiratory diseases are common in domestic animals and they generate economic impacts related to productive loss, such as reduced weight gain and growth, drug costs and death (Azizi et al., 2013). Pneumonia in sheep can occur in lambs and adult animals depending on the existence of predisposing factors, it being considered a common disease (Azizi et al., 2013; Glendinning et al., 2017). Factors such as age, geographic location, environmental stressors, climate, nutritional status, immunosuppression, unhygienic conditions, managing system can contribute to the development of this disease (Azizi et al., 2013; Bell, 2008; Kalogianni et al., 2020). In sheep, the recent transport history can be considered a stress factor that predisposes to pneumonia (Brogden et al., 1998; Chakraborty et al., 2014; Scott, 2011). Reports of pneumonia in sheep caused by different etiologies have already been described in the literature (Azizi et al., 2013; Bell, 2008; Carmo et al., 2020; Cid et al., 2019; Jaý & Tardy, 2019; Kalogianni et al., 2020), however there are no reports of *P. stuartii*.

The macroscopic and histological changes found in the lungs of the sheep were compatible with interstitial and fibrinopurulent bronchopneumonia (Ackermann & Brogden, 2000). Sepsis in primates by *P. stuartii*, with the presence of fibrin and edema in the bronchi and bronchioles, has also been described by Liu et al. (2016). Histologically, there was intense neutrophil infiltration and exudation of fibrin in the alveoli, bronchi and bronchioles. Exudate is accompanied by necrosis and degenerate neutrophils (Hussain et al., 2017). These microscopic findings were present in the sheep, indicating fibrinopurulent bronchopneumonia. Tracheitis and acute suppurative bronchopneumonia have been reported in lambs associated with bacterial infections (Azizi et al., 2013; Hussain et al., 2017).

In the two lung samples, bacteria with phenotypic characteristics similar to *P. stuartii* (O'Hara et al., 2000) were isolated and their identity was confirmed molecularly (Ovchinnikova et al., 2013). The source of infection was not determined in these cases; however, it may have originated from the environment since it is found in soil, water and manure.

As an opportunistic pathogen in humans and animals, *P. stuartii* can be associated with primary and secondary infections (O'Hara et al., 2000). This microorganism has rarely been described in the veterinary literature, with no reports on the presence of this microorganism as a pathogen in respiratory tract infections of sheep to date.

5. Conclusion

Descriptions of respiratory diseases are common in farm animals, however, in sheep there is no pneumonia associated with *P. stuartii*. This etiological agent is an important public health pathogen that is associated with antibiotic resistance and it is widely distributed in the environment. There have been few studies on *P. stuartii* in animals, and this is the first report of the presence of this microorganism as a cause of interstitial and fibrinopurulent bronchopneumonia in sheep, confirmed by pathological findings, microbiological and molecular analyses. Therefore, it is suggested that epidemiological surveillance strategies should be carried out in animals to better understand their role in the dissemination of this pathogen.

Acknowledgments

We are grateful to the Coordination of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) for the concession of a doctoral scholarship.

References

- Ackermann, M.R., & Brogden, K.A. (2000). Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Microbes and Infection*, 2(9), 1079-1088. doi:10.1016/S1286-4579(00)01262-4.
- Almeida, F. S., Rigobelo, E.C., Marin, J.M., Maluta, R.P., & Ávila, F.A. (2007). Diarréia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *ARS Veterinaria*, 23(3), 151-157. doi:10.15361/2175-0106.2007v23n3p151-157
- Azizi, S., Korani, F.S., & Oryan, A. (2013). Pneumonia in slaughtered sheep in south-western Iran: pathological characteristics and aerobic bacterial aetiology. *Veterinaria Italiana*, 49(1), 109-118. PMID: 23564592
- Barbour, E.K., Hajj, Z.G., Hamadeh, S., Shaib, H.A., Farran, M.T., Araj, G., Faroon, O., Barbour, K.E., Jirjis, F., Azhar, E., Kumosani, T., & Harakeh, S. (2012). Comparison of phenotypic and virulence genes characteristics in human and chicken isolates of *Proteus mirabilis*. *Pathogens and global health*, 106(6), 352–357. doi:10.1179/2047773212Y.0000000042
- Barl, P., Bedenic, B., Sardelic, S., Uzunovic, S., Vranes, J., & Plecko, V. (2012). Spread of CTX-M-15 positive *Providencia* spp. causing urinary tract infections at the University Hospital Split in Croatia. *Medicinski Glasnik (Zenica)*, 9(2), 317-324. PMID: 22926370
- Bell, S. (2008). Respiratory disease in sheep: 1. Differential diagnosis and epidemiology. *In Practice*, 30(4), 200–207. doi:10.1136/inpract.30.4.200
- Brogden, K.A., Lehmkuhl, H.D., & Cutlip, R.C. (1998). *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Veterinary research*, 29, 233-254. PMID: 9689740
- Carmo, P., Uzal, F. A., Pedroso, P., & Riet-Correa, F. (2020). Conidiobolomycosis, cryptococcosis, and aspergillosis in sheep and goats: a review. *Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 826–834. doi:10.1177/1040638720958338
- Chakraborty, S., Kumar, A., Tiwari, R., Rahal, A., Malik, Y., Dhama, K., Pal, A., & Prasad, M. (2014). Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Veterinary Medicine International*, 2014. doi:10.1155/2014/508304.

- Chamberland, R.R., McElvania, T.E., Burnham, C.A., & Kennedy, D.J. (2013). Renal abscess caused by a *Providencia stuartii* isolate biochemically misidentified as *Pasteurella*. *Journal of clinical microbiology*, 51 (8), 2775–2777. doi:10.1128/JCM.00937-13.
- Cid, D., García-Alvarez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., & Vela, A.I. (2019). *Pasteurella multocida* isolates associated with ovine pneumonia are toxigenic. *Veterinary microbiology*, 232, 70–73. doi:10.1016/j.vetmic.2019.04.006
- Crane, E.S., Shum, M., & Chu, D.S. (2016). Case report: *Providencia stuartii* conjunctivitis. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 6(1), 29. doi:10.1186/s12348-016-0097-9.
- DI, H., Liang, S., Li, Q., Shi, L., Shima, A., Meng, H., Yan, H., & Yamasaki, S. (2018). *Providencia* in retail meats from Guangzhou, China and Osaka, Japan: prevalence, antimicrobial resistance and characterization of classes 1, 2 and 3 integrons. *The Journal of veterinary medical science*, 80(5), 829–835. doi:10.1292/jvms.18-0037
- Farmer, J. J., 3rd, Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., & Fanning, G. R. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 21(1), 46–76. doi:10.1128/jcm.21.1.46-76.1985
- George, E. A., Kornik, R., & Robinson-Bostom, L. (2020). *Providencia stuartii* septic vasculitis. *JAAD case reports*, 6(5), 422–425. doi:10.1016/j.jdc.2020.02.043
- Glendinning, L., Collie, D., Wright, S., Rutherford, K.M.D., & McLachlan, G. (2017). Comparing microbiotas in the upper aerodigestive and lower respiratory tracts of lambs. *Microbiome*, 145 (5), 2-9. doi:10.1186/s40168-017-0364-5.
- Hussain, R., Mahmood, F., Ali, H. M., & Siddique, A. B. (2017). Bacterial, PCR and clinico-pathological diagnosis of naturally occurring pneumonic pastorellosis (mannheimiosis) during subtropical climate in sheep. *Microbial pathogenesis*, 112, 176–181. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.061
- Iwata, S., Tada, T., Hishinuma, T., Tohya, M., Oshiro, S., Kuwahara-Arai, K., Ogawa, M., Shimojima, M., & Kirikae, T. (2020). Emergence of Carbapenem-Resistant *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii* Producing IMP-Type Metallo- β -Lactamase in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(11), e00382-20. doi:10.1128/AAC.00382-20
- Jaý, M., & Tardy, F. (2019). Contagious Agalactia In Sheep And Goats: Current Perspectives. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 10, 229–247. doi:10.2147/VMRR.S201847
- Juneja, P., & Lazzaro, B. P. (2009). *Providencia sneebia* spp. nov. and *Providencia burhodogranariae* spp. nov., isolated from wild *Drosophila melanogaster*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 5), 1108–1111. doi:10.1099/ijs.0.000117-0
- Kalogianni, A.I., Bossis, I., Ekateriniadou, L.V., & Gelasakis, A.I. (2020). Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(4), 616. doi:10.3390/ani10040616
- Krake, P.R., & Tandon, N. (2004). Infective endocarditis due to *Providencia stuartii*. *Southern medical journal*, 97(10), 1022–1023. doi:10.1097/01.smj.0000141308.19657.ba
- Ksentini, I., Gharsallah, H., Sahnoun, M., Schuster, C., Hamli Amri, S., Gargouri, R., Triki, M.A. Ksantini, M., & Leclercq, A. (2019). *Providencia entomophila* spp. nov., a new bacterial species associated with major olive pests in Tunisia. *PLoS ONE*, 14 (10); e0223943. doi:10.1371/journal.pone.0223943.
- Lane D.J. (1992). *16S/23S rRNA sequencing*. In Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons. 115-175.

- Liakopoulos, A., Oikonomou, O., & Wareham, D.W. (2017). Draft genome sequence of *Providencia stuartii* PS71, a multidrug-resistant strain associated with nosocomial infections in Greece. *Genome Announc*, 5(12): e00056-17. doi:10.1128/genomeA.00056-17.
- Lin, K., Lin, A.N., Linn, S., Reddy, M., & Bakshi, A. (2017). Recurrent primary suprahepatic abscess due to *Providencia Stuartii*: a rare phenomenon. *Cureus*, 9(9), e1691. doi:10.7759/cureus.1691.
- Liu, D. X., Didier, P. J., Plauche, G., & Pahar, B. (2016). Septicemia in an Indian Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) associated with *Providencia stuartii*. *Journal of medical primatology*, 45(6), 330–332. doi:10.1111/jmp.12230
- Liu, J., Wang, R., & Fang, M. (2020). Características clínicas e de resistência aos medicamentos das infecções por *Providencia stuartii* em 76 pacientes. *The Journal of international medical research*, 48 (10), 300060520962296. doi:10.1177/0300060520962296
- Muller, H.E., O'Hara, C.M., Fanning, G.R., Hickman-Brenner, F.W., Swenson, J.M., & Brenner, D.J. (1986). *Providencia heimbachae*, a new species of Enterobacteriaceae isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 36, 252-256. doi:10.1099/00207713-36-2-252.
- O'Hara, C.M., Brenner, F.W., & Miller, J.M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 534-546. doi:10.1128/cmr.13.4.534546.2000.
- Ovchinnikova, O. G., Rozalski, A., Liu, B., & Knirel, Y. A. (2013). O-antigens of bacteria of the genus *Providencia*: structure, serology, genetics, and biosynthesis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78(7), 798–817. doi:10.1134/S0006297913070110
- Papadogiannakis, E., Perimeni, D., Velonakis, E., Kontos, V., & Vatopoulos, A. (2007). *Providencia stuartii* infection in a dog with severe skin ulceration and cellulitis. *The Journal of small animal practice*, 48(6), 343–345. doi:10.1111/j.1748-5827.2006.00266.x
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick E.S. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Blackwell Science Ltd, Oxford. 1231p.
- Sambrook, J., & Russell D.W. (2004). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.565 – 567.
- Scott, P.R. (2011). Treatment and control of respiratory disease in sheep. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27(1), 175–186. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.016
- Sipahi, O. R., Bardak-Ozdemir, S., Ozgiray, E., Aydemir, S., Yurtseven, T., Yamazhan, T., Tasbakan, M., & Ulusoy, S. (2010). Meningitis due to *Providencia stuartii*. *Journal of clinical microbiology*, 48(12), 4667–4668. doi:10.1128/JCM.01349-10
- Somvanshi, V. S., Lang, E., Sträubler, B., Spröer, C., Schumann, P., Ganguly, S., Saxena, A. K., & Stackebrandt, E. (2006). *Providencia vermicola* spp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 3), 629–633. doi:10.1099/ijs.0.63973-0
- Tavares, C. P., Pereira, P. S., Marques, E., Faria, C., Jr, de Souza, M., de Almeida, R., Alves, C., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. (2015). Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 82(4), 326–330. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.002
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(4), 327–338. doi:10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x

Anexo A – CLASSIFICAÇÃO DO PERIÓDICO

Artigo 1: Molecular detection of *Brucella abortus* in wild and captive felids

PLATAFORMA Sucupira

ACESSO RESTRITO

INÍCIO » Qualis » Qualis Periódicos

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS TRIÊNIO 2010-2012

Área de Avaliação:
 MEDICINA VETERINÁRIA

ISSN:

Título:
 Brazilian Journal of Infectious Diseases

Classificação:
 --SELECIONE--

Consultar Cancelar

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1413-8670	THE BRAZILIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES (IMPRESSO)	MEDICINA VETERINÁRIA	B1

Início Anterior 1 Próximo Fim

Disponível em:

<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>

Acesso em: 29 de Dezembro de 2021.

Artigo 2: Bronchopneumonia in sheep associated with *Providencia stuartii*

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016

Área de Avaliação:
 INTERDISCIPLINAR

ISSN:
 2525-3409

Título:
 RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

Classificação:
 -- SELECIONE --

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
2525-3409	RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT	INTERDISCIPLINAR	B4

Início Anterior 1 Próximos Fim

Disponível em:

<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>

Acesso em: 29 de Dezembro de 2021

ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO

Artigo 1: Molecular detection of *Brucella abortus* in wild and captive felids

RE: Decision on submission to Brazilian Journal of Infectious Diseases

De: em.bjid.0.7a46f8.1091901a@editorialmanager.com <em.bjid.0.7a46f8.1091901a@editorialmanager.com> em nome de Brazilian Journal of Infectious Diseases <em@editorialmanager.com>

Enviado: segunda-feira, 28 de março de 2022 08:49

Para: Francielle Cristina Kagueyama <franciellekagueyama@hotmail.com>

Assunto: Decision on submission to Brazilian Journal of Infectious Diseases

Manuscript Number: BJID-D-21-00583R1

Molecular detection of *Brucella abortus* in wild and captive felids

Dear Molecular detection of *Brucella abortus* in wild an Kagueyama,

Thank you for submitting your manuscript to Brazilian Journal of Infectious Diseases.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication.

I would like to inform you that you need to pay the publishing fee to get your paper published in the journal. More information on Open Access in this journal can be found in the Guide for Authors.

For any queries relating to invoicing and the publication timeline of your paper, please contact us at bjid@elsevier.com.

Your accepted manuscript will now proceed to the technical reviewer and then it will be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

We appreciate and value your contribution to Brazilian Journal of Infectious Diseases. We regularly invite authors of recently published manuscript to participate in the peer review process. If you were not already part of the journal's reviewer pool, you have now been added to it. We look forward to your continued participation in our journal, and we hope you will consider us again for future submissions.

Kind regards,
Luciano Z. Goldani

Artigo 2: Bronchopneumonia in sheep associated with *Providencia stuartii*

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

[Register](#) [Login](#)

HOME CURRENT ARCHIVES ABOUT -
SEARCH

HOME / ARCHIVES / VOL.10 NO.16 / Agrarian and Biological Sciences

Bronchopneumonia in sheep associated with *Providencia stuartii*

Francielle Cristina Kagueyama
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0002-9760-3400>

Fernanda Harumi Maruyama
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0002-1847-7574>

Edson Moleta Colodel
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0002-7866-3125>

Lucas Avelino Dandolini Pavelegini
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0001-9241-6641>

Luciano Nakazato
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0002-1244-0690>

Valéria Dutra
Federal University of Mato Grosso
<https://orcid.org/0000-0002-6630-2293>

DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23295>

Keywords: Microbiology; Pathology; Pneumonia; Sequencing; Sheep.



VOLUME 10 | NUMBER 16 | YEAR 2021

ISSN 2525-3489

PDF

PUBLISHED
08/12/2021

MAKE A SUBMISSION

JOURNAL METRICS

Índice HS (Google Metrics): 14 (2021)

Score CiteFactor: 1.78 (2020-21)

LANGUAGE

English

Español (España)

Português (Brasil)