

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

**ASPECTOS ETIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE  
HEMOPARASITOSE EM FELINOS DOMÉSTICOS DE  
CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO**

Ísis Assis Braga

Cuiabá-MT  
2017

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

**ASPECTOS ETIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE  
HEMOPARASITOSE EM FELINOS DOMÉSTICOS DE  
CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO**

**Discente: Ma. Ísis Assis Braga**  
**Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato**

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

Cuiabá-MT  
2017

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A848a Assis Braga, Ísis.  
Aspectos etiológicos e epidemiológicos de hemoparasitoses em felinos domésticos de Cuiabá e Várzea Grande, Mato Grosso / Ísis Assis Braga. -- 2017  
85 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.  
Co-orientador: Luciano Nakazato.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Hepatozoon spp.. 2. Cytauxzoon spp., Babesia spp.. 3. Bartonella spp.. 4. Ehrlichia spp.. 5. Artrópodes. I. Título.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

AUTORA: BRAGA, Isis Assis

### **TÍTULO: ASPECTOS ETIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE HEMOPARASITOSE EM FELINOS DOMÉSTICOS DE CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

**Aprovada em 23 de Fevereiro de 2017.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar  
(Faculdade de Medicina Veterinária/ UFMT)

---

Prof. Dr. Richard de Campos Pacheco  
(Faculdade de Medicina Veterinária/ UFMT)

---

Prof. Dr. Afonso Lodovico Sinkoc  
(Faculdade de Medicina Veterinária/ UFMT)

---

Prof. Dr. Dirceu Guilherme de Souza Ramos  
(Curso de Medicina Veterinária/ UFG)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Lima Tomé Melo  
(Curso de Medicina Veterinária/ UNIC)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,  
pelo apoio absoluto e amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força e sabedoria concedida em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, João Geraldo e Eliete, pelos conselhos e apoio durante essa etapa. E que sempre estiveram de braços abertos para me receber durante os momentos de angústia e cansaço.

Ao meu irmão e aos meus avós, por existirem na minha vida como exemplo de superação, dedicação e persistência.

Ao meu companheiro e aos amigos, pelos momentos de descontração e alegria.

Aos meus colegas de pós-graduação, que se tornaram bons amigos e muitas vezes me acolheram dentro de suas próprias casas, em especial a minha Xará, que foi essencial durante todo o percurso.

Aos professores do programa, por todo ensinamento e palavras de sabedoria.

Ao meu orientador, por ter me guiado com dedicação, seriedade e paciência. Me ofereceu toda liberdade para desenvolver os projetos de pesquisa, me confiou sua sala de aula e seus alunos para que eu pudesse adquirir experiência na docência. Me apresentou o fantástico mundo dos “agentes infecciosos”!!! Foram anos incríveis de aprendizado, superação, risadas, broncas, desentendimentos, mas muito respeito. Serei eternamente grata por tudo, mas principalmente por ter sido compreensível e humano nos meus momentos de fraqueza.

## RESUMO

### ASPECTOS ETIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE HEMOPARASITOSE EM FELINOS DOMÉSTICOS DE CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO

Hemoparasitoses transmitidas por artrópodes que infectam felinos domésticos têm sido consideradas emergentes na medicina veterinária e humana. A erliquiose felina tem sido descrita em diversas regiões do mundo, porém pouco se sabe sobre as espécies envolvidas, transmissão e patogenia da mesma. Outra hemoparasitose importante é a bartonelose, que se destaca por ser de caráter zoonótico. Os felinos domésticos são considerados os principais reservatórios e portadores de *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*, sendo o principal vetor, a pulga *Ctenocephalides felis*. Alguns protozoários transmitidos por artrópodes como, *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. também têm sido descritos circulando em felinos domésticos em diversos países. O objetivo deste é fornecer dados sobre os aspectos etiológicos e epidemiológicos de determinadas hemoparasitoses em felinos domésticos dos municípios de Cuiabá e Várzea Grande do estado de Mato Grosso, dando subsídios para a melhor compreensão destas enfermidades em felinos. Sendo assim, técnicas moleculares e sorológicas foram aplicadas em amostras de sangue e soro de felinos oriundos de distintas localidades de ambos os municípios, com o intuito de descrever as espécies de parasitas circulantes na região.

**Palavras-chave:** *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., Artrópodes.

## ABSTRACT

### ETIOLOGIC AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF HEMOPARASITOSEs IN DOMESTIC FELINE FROM CUIABÁ AND VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO

Arthropod-borne hemoparasites infecting domestic felines have been considered emerging in veterinary and human medicine. Feline ehrlichiosis has been described in several regions of the world, but little is known about the species involved, transmission and pathogenesis of it. Another important hemoparasitosis is bartonellosis, which stands out because of its zoonotic nature. Domestic felids are considered the main reservoirs and carriers of *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* and *B. koehlerae*, being the main vector, the flea *Ctenocephalides felis*. Some protozoa transmitted by arthropods such as *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. Have also been described circulating in domestic felines in several countries. The objective of this study is to provide data on the etiological and epidemiological aspects of certain hemoparasitoses in domestic felines in the municipalities of Cuiabá and Várzea Grande in the state of Mato Grosso, providing subsidies for a better understanding of these diseases in felines. Thus, molecular and serological techniques were applied in blood and serum samples from felines from different localities of both municipalities, with the purpose of describing the species of circulating parasites in the region.

**Key words:** *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., Arthropods.



## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Ehrlichia</i> spp.	13
1.2 <i>Bartonella</i> spp.	14
1.3 <i>Hepatozoon</i> spp.	15
1.4 <i>Babesia</i> spp.	16
1.5 <i>Cytauxzoon</i> spp.	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
APÊNDICE A – Artigo Científico 1	26
APÊNDICE B – Artigo Científico 2	32
APÊNDICE C – Tabelas 1 e 2	52
APÊNDICE D – Figura 1	56
APÊNDICE E – Artigo Científico 3	58
APÊNDICE F – Tabela 1	68
APÊNDICE G – Figura 1	70
APÊNDICE H – Artigo Científico 4	72
APÊNDICE I – Tabela 1	85



### CERTIFICADO

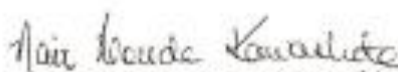
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.017751/11-7, sobre "Detecção molecular e soroprevalência de *Ehrlichia* spp. em felinos domésticos da região metropolitana de Cuiabá, MT", sob a responsabilidade de **ÍSIS ASSIS BRAGA/Prof. Dr. DANIEL MOURA DE AGUIAR**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)-UFMT em reunião ordinária de **15/09/2011**.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.017751/11-7, entitled "Molecular detection and seroprevalence of *Ehrlichia* spp. domestic cats in the metropolitan area of Cuiabá, MT", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Set 15, 2011**.

  
Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso  
Presidente

Cuiabá-MT, 16 de setembro de 2011.

  
Profª Drª Nair Honda Kawashita  
Vice-Presidente



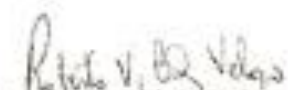
## CERTIFICADO

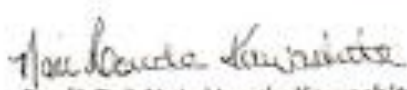
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.019110/12-2, sobre "Caracterização clínico-laboratorial de felinos domésticos infectados experimentalmente com o isolado São Paulo de *Ehrlichia canis*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. DANIEL MOURA DE AGUIAR/ÍSIS ASSIS BRAGA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)-UFMT em reunião ordinária de 17/05/2012.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.019110/12-2, entitled "Clinical and laboratory characterization of domestic cats experimentally infected with the São Paulo strain of *Ehrlichia canis*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on May 17, 2012.

Cuiabá-MT, 17 de maio de 2012.

  
Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso  
Presidente

  
Profª Drª Nair Honda Kawashita  
Vice-Presidente

## 1. INTRODUÇÃO

A emergência e a reemergência de doenças transmitidas por artrópodes anteriormente controladas, são desafios para a medicina humana e veterinária. Ambos, os artrópodes e as infecções transmitidas pelos mesmos, estão expandindo sua extensão zoogeográfica, devido às alterações climáticas e a maior acessibilidade aos nichos ambientais. Além do mais, a transição de animais de companhia de regiões com alta prevalência de artrópodes e das doenças transmitidas por eles, introduziu ambos em áreas não endêmicas (Shaw et al., 2001).

Estudos relacionados às doenças transmitidas por artrópodes em felinos domésticos ainda são escassos. A erliquiose felina tem sido investigada a fim de se compreender a patogênese e estabelecer um padrão característico da infecção (Buoro et al., 1989; Bouloy et al., 1994; Beaufils et al., 1995; Braga et al., 2013). Ainda é desconhecido se gatos tornam-se persistentemente infectados ou se desenvolvem implicações imunopatológicas como resultados de infecção crônica, semelhante ao que ocorre em cães (Shaw et al., 2001).

Anteriormente foi realizado em estudo o qual demonstrou a presença de *Ehrlichia canis* circulando na população felina da região metropolitana de Cuiabá, MT (Braga et al., 2014). Embora sequências de *E. canis* baseadas no gene 16S rRNA terem demonstrado 94% - 100% similares entre isolados de diversas regiões do mundo, alguns estudos têm demonstrado elevado grau de diversidade da *E. canis*, baseando-se na diferença do gene que codifica a proteína “TRP36” (*tandem repeat proteins*) (Doyle et al., 2005, Zhang et al., 2008, Hsieh et al., 2010, Aguiar et al., 2013)

Dentre as doenças emergentes, a bartonelose, que também é conhecida por “doença da arranhadura do gato”, destaca-se por ser de caráter zoonótico, representando um problema de saúde pública. Os gatos domésticos são descritos como os reservatórios da *Bartonella* spp. (Kordick et al., 1997). O gênero *Bartonella* apresenta uma distribuição mundial com elevada prevalência em países com clima quente e úmido, onde as condições são mais favoráveis para os vetores artrópodes, principalmente pulgas (Glaus et al., 1997). As infecções em gatos têm sido documentadas em vários

países da Europa, Ásia, Oceania e América, sendo as espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* as mais frequentemente detectadas (Brunt et al., 2006).

Além das bactérias supracitadas, alguns protozoários transmitidos por artrópodes têm sido descritos em gatos domésticos do Brasil, como *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. (Criado-Fornelio et al., 2006; André et al., 2014; Maia et al., 2013). Entre os piroplasmídeos, várias espécies já foram descritas em felinos: *Babesia felis*, *B. cati*, *B. herpailuri*, *B. pantherae*, *B. leo*, *B. canis* e *Cytauxzoon felis* (Baneth et al., 2004). A espécie de *Hepatozoon* que acomete felinos, anteriormente denominada *Leucocytozoon felis domesticus*, era considerada indistinguível da espécie infectante dos canídeos, devido à grande semelhança morfológica do parasita observado no sangue destes animais (Baneth et al., 2013).

Shaw et al. (2001) observaram que os artrópodes comumente relacionados às transmissões de hemoparasitas em gatos, são as pulgas da família Pulicidae e carrapatos da família Ixodidae, e muitos destes são hospedeiros tanto para cães quanto para gatos. Sabe-se que os gatos parecem ser menos predispostos às infestações por carrapatos e aos parasitos transmitidos por esses artrópodes que os cães. Além disso, esses animais têm uma suposta resistência inata ou adaptação às infecções, o que limita o desenvolvimento das doenças ou compromete a transmissão de agentes infecciosos entre carrapatos e gatos (Shaw et al., 2001).

Estas enfermidades na maioria das vezes, são de complexo diagnóstico, pois as mesmas podem ocorrer em animais saudáveis, ou mesmo com apresentação de sinais clínicos inespecíficos. Adicionalmente, a falha no diagnóstico pode estar relacionada com o baixo número de agentes patogênicos em sangue periférico, devido ao tropismo hemático, o que dificulta a detecção por exame direto, assim como o seu isolamento e cultura e bem como as reações cruzadas com outros organismos por meio de testes sorológicos para detecção de anticorpos (Tabar et al., 2008).

### **1.1 *Ehrlichia* spp.**

*Ehrlichia* spp. pertence à Ordem Rickettsiales e Família Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001). São parasitos intracelulares obrigatórios Gram-negativos, que se

situam em vacúolos citoplasmáticos de células hematopoiéticas maduras ou imaturas e células endoteliais nos hospedeiros vertebrados ou no intestino e glândula salivar dos hospedeiros artrópodes (Groves et al., 1975; Unver et al., 2001). Estes organismos se mantêm na natureza através de interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (Dumler et al., 2001).

*E. canis* é a principal espécie circulante no Brasil, e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* está envolvido na transmissão do agente em cães (Labruna e Pereira, 2001). Os ciclos naturais e o potencial desses artrópodes na transmissão de doenças em gatos domésticos não estão totalmente elucidados (Amyx e Huxsoll, 1997). Não obstante, sabe-se que o carrapato *R. sanguineus* é trioxeno e têm hábitos nidícolas (do latim *nidi*=ninho; *cola*=que permanece) e demonstra ampla distribuição geográfica urbana no Brasil, onde encontra condições favoráveis para o parasitismo e reprodução (Labruna e Pereira, 2001).

Vista como agente causal de disfunções hematológicas em cães, a patogenia gerada pela infecção por *E. canis* em felinos domésticos não foi totalmente esclarecida e são escassos os relatos que discorrem no que se refere as alterações clínicas e laboratoriais manifestadas na erliquiose felina. Contudo, estudos sugerem que a erliquiose seja incluída no diagnóstico diferencial de gatos com presença de leucopenia, anemia e trombocitopenia associado à apatia e febre (Buoro et al., 1989; Bouloy et al., 1994; Beaufils et al., 1995; Braga et al., 2013a; Braga et al., 2013b).

## **1.2 *Bartonella* spp.**

As bactérias do gênero *Bartonella* são Gram negativas e intracelulares facultativas e infectam mamíferos e artrópodes (Brunt et al., 2006). Diversas espécies de *Bartonella* spp. têm a competência de infectar os gatos domésticos, e estes animais são considerados reservatórios primários de *B. clarridgeiae*, *B. henselae* e possivelmente de *B. koehlerae* (Brunt et al., 2006; Guptill, 2010). Mais de 14 espécies de *Bartonella* são consideradas zoonóticas ou potencialmente zoonóticas (Guptill, 2010).

A “doença da arranhadura do gato” é causada pela *B. henselae*, uma bactéria hemotrófica que infecta humanos, mamíferos domésticos e selvagens. Intimamente

relacionada com *B. henselae*, a *B. clarridgeiae* compreende cerca de 10-30% dos isolados de *Bartonella* em gatos clinicamente saudáveis e em lesões cardíacas e hepáticas de cães (Kordick et al., 1997). Além disso, a *B. clarridgeiae* tem sido associada sorologicamente com a bartonelose em humanos (Breitschwerdt e kordick, 2000).

O mais importante vetor da *Bartonella* spp. é a pulga *Ctenocephalides felis*, a qual transmite a bactéria ao hospedeiro felino através das fezes (Guptill et al., 2010). Somente alguns gatos naturalmente infectados apresentam sinais clínicos que vão desde febre transitória, linfadenomegalia, abscessos ou microabscessos em diferentes órgãos, endocardite e sinais do sistema nervoso central, como nistagmo, tremores, convulsões e alterações comportamentais (Shaw et al., 2001).

A transmissão para os seres humanos ocorre principalmente através de arranhaduras ou mordidas dos gatos. Nos seres humanos, esta infecção pode ser assintomática e pode desaparecer espontaneamente sem qualquer tratamento, no entanto, em alguns casos, a doença pode ser fatal se não tratada (Lamas et al., 2010).

### **1.3 *Hepatozoon* spp.**

O gênero *Hepatozoon* compreende mais de 300 espécies de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa (Almosny, 2002; Ewing e Panciera, 2003), acometendo várias espécies de animais domésticos e silvestres (Vicente-Johnson et al., 2003).

A detecção de *Hepatozoon* em felinos foi pela primeira vez descrita por Patton em 1908 na Índia (Baneth et al., 2013). Com base nas avaliações morfológicas e morfométricas da espécie de *Hepatozoon* detectado em gatos, havia se estabelecido que este parasita era indistinguível do *H. canis* detectados em cães (Wenyon, 1926; Perez et al., 2004). No entanto, com base na caracterização molecular do *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos e selvagens, demonstrou-se que mais de uma espécie de *Hepatozoon* pode estar associada com a ocorrência de infecções na população felina (Criado-Fornelio et al, 2006; Baneth et al, 2013.).

No Brasil, Rubini et al. (2006) realizaram a primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. em gatos e demonstraram que as sequências de nucleotídeos de isolados brasileiros de *Hepatozoon* detectados em gatos estavam intimamente

relacionadas com isolados brasileiros de *H. canis* de cães. Entretanto, uma nova espécie de *Hepatozoon* geneticamente distinta de *H. canis* foi caracterizado em gatos no sul da Espanha (Criado Fornelio-et al., 2006). Além disso, em um estudo recente, Baneth et al. (2013) descreveram a espécie *H. felis* com base em uma análise filogenética e morfológica, sugerindo que os felinos são infectados principalmente por *H. felis*, que inclusive possui predileção por tecido muscular. Além disso, demonstrou-se que os gatos podem se infectar tanto pela espécie *H. felis* quanto pelo *H. canis*.

A transmissão do *hepatozoon* ocorre quando se ingerem carrapatos, contendo oocistos maduros da hemocele. Após a ingestão, os esporozoítos são liberados no trato gastrointestinal, penetram na parede intestinal e são transportados através do sangue para tecidos hemolinfáticos, incluindo o baço, medula óssea e gânglios linfáticos. O vetor do *hepatozoon* em cães e gatos ainda não estão totalmente elucidados, entretanto considera-se o carrapato *R. sanguineus* o principal vetor de *H. canis* (Baneth et al., 2001). Além do mais, alguns estudos têm demonstrado a participação do *Amblyomma ovale* na transmissão de *Hepatozoon* em cães (Forlano et al., 2005; Rubini et al., 2009)

#### 1.4 *Babesia* spp.

O gênero *Babesia* compreende um grupo de protozoários parasitas intracelulares obrigatórios de eritrócitos (Farkas, 2002), mundialmente distribuídos e causadores de uma doença conhecida como babesiose em vários tipos de hospedeiros (Irwin, 2009), onde o principal fator patogênico é a hemólise (Almosny, 2002; Taboada e Lobetti, 2006) e com transmissão associada a carrapatos ixodídeos (Irwin, 2009).

Diversas espécies e subespécies de *Babesia* foram descritas ao redor do mundo em gatos domésticos: *B. canis*; *B. vogeli*; *B. cati*; *B. felis*; *B. herpailuri*; *B. hongkongensis*; *B. leo*; *B. microti*; e *B. pantherae* (Baneth et al., 2004; Taboada e Lobetti, 2006), e a espécie *B. felis* a mais comum (Shoeman et al., 2001).

A ocorrência de babesiose em felídeos foi primeiramente relatada na Índia por Lingard e Jennings em 1904 (Bendangla e Varshney, 2006). Casos esporádicos de infecção em gatos domésticos por espécies não identificadas de *Babesia* sp. foram descritos na Alemanha, França, Tailândia e Zimbábue (Baneth et al., 2004). No Brasil,



são poucos os relatos de babesiose felina. Hemoparasitos semelhantes a *B. felis* foram detectados em esfregaços sanguíneos em gatos domésticos no Rio de Janeiro (Souza, 2002; Gazeta et al., 2004); entretanto, os autores não caracterizaram a espécie. Almeida et al. (2004) observaram piroplasmídeos em 47% de gatos indigentes examinados. Porém, estes autores não puderam distinguir *Babesia* spp. de *Cytauxzoon felis*. André et al. (2014) demonstraram a infecção por *B. vogeli* em gatos errantes de um zoológico no Brasil.

### **1.5 *Cytauxzoon* spp.**

São protozoários parasitos do Filo Apicomplexa, dentro do qual estão presentes seres dotados de complexo apical, importante na fixação e invasão de células do hospedeiro. Por fim, encontram-se classificados como parasitos da Classe Piroplasmidia e na Família Theileriidae (Rey, 2002).

A espécie *Cytauxzoon felis* foi descrita pela primeira vez em gatos domésticos na região sudoeste do Missouri, nos Estados Unidos da América (EUA), por Wagner em 1976. No Brasil, a *Cytauxzoonose* felina é uma doença ainda pouco conhecida, tendo sido raramente diagnosticada. Seu primeiro diagnóstico realizado foi em leões mantidos num zoológico no estado do Rio de Janeiro (Soares, 2001). Maia et al. (2013) descreveram pela primeira vez no Brasil, gatos domésticos infectados por *C. felis*, através de técnicas moleculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M., ZHANG, X., MELO, A.L., PACHECO, T.A., MENESES, A.M., ZANUTTO, M.S., HORTA, M.C., SANTARÉM, V.A., CAMARGO, L.M., MCBRIDE, J.W., LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v.164, p.315–321, 2013.

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

AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Red and gray foxes--potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v.9, p.47-50, 1997.

ANDRÉ, M. R.; BACCARIM-DENARDI, N. C.; MARQUES DE SOUZA, K. C.; GONÇALVES, L. R.; HENRIQUE, P. C.; GROSSE ROSSI ONTIVERO, C. R.; LIMA-GONZALEZ, I. H.; CABRAL-NERY, C. V.; FERNANDES-CHAGAS, C. R.; MONTICELLI, C.; ALEXANDRE DE SANTIS, A. C.; MACHADO, R. Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.5, p.545-551, 2014.

BANETH, G., KENNY, M.J., TASKER, S. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.99-105, 2004.

BANETH, G.; SHEINER, A.; EYAL, O.; HAHN, S.; BEAUFILS, J. P.; ANUG, Y.; TALMI-FRANK. Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. **Parasite and Vectors**, v.6, p.120, 2013.

BENDANGLA, C.; VARSHNEY, J.P. Babesiosis in a domestic kitten - A clinical report. **Journal of Veterinary Parasitology**, v.20, n.1, p. 103-104, 2006.

BEAUFILS, J.P., MARIN-GRANEL, J., JUMELLE, P. *Ehrlichia* infection in cats: a review of three cases. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**. v.30, p.397–402, 1995.

BOULOY, R.P., LAPPIN, M.R., HOLLAND, C.H., HRALL, M.A., BAKER, D., O'NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.204, p.1475–1478, 1994.

BRAGA, I.A., SANTOS, L.G.F., MELO, A.L.T., JAUNE, F.W., ZILIANI, T.F., GIRARDI, A.F., AGUIAR, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, p.470-474, 2013a.

BRAGA, I.A., TAQUES, I.I.G.G., SANTOS, L.G.F., COSTA, S.R.O.C., DIAS, I.S.O., AGUIAR, D.M. Erliquiose Felina: Relato de co-infecção com vírus da imunodeficiência felina. **Acta Veterinária Brasilica**. v.7, p.249-250, 2013b.

BREITSCHWERDT, E.B., KORDICK, D.L. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Reviews**. V.13, p. 428–38, 2000.

BRUNT, J., GUPTILL, L., KORDICK, L.D., KUDRAK, S., LAPPIN, R.M. American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p. 213-226, 2006.

BUORO, I.B.J., ATWEL, R.B., KIPTOON, J.C., IHIGA, M.A. Feline anemia associated with *Ehrlichia*-like bodies in three domestic shorthaired cats. **Veterinary Research**. v.125, p.434-436, 1989.

CHARPENTIER, F.; GROULADE, P. Report of one case of probable feline ehrlichiosis. **Bulletin De L Academie Veterinaire De France**, v. 59, p. 287-290, 1986.

CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J. L.; CASADO, N.; FARIAS, N. A.; SOARES, M. P.; MÜLLER, G.; BRUM, J. G.; BERNE, M. E.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v.92, p.93-99, 2006.

DOYLE, C.K., CÁRDENAS, A.M., AGUIAR, D.M., LABRUNA, M.B., NDIP, L.M., YU, X.J.,MCBRIDE, J.W. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E.chaffeensis* gp47 tandem repeats among isolates from different geographic locations. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1063, p.433-435, 2005.

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

EWING, S. A.; PANCIERA, R. J. American canine hepatozoonosis. **Clinical Medical Reviews**, v.16, p.688-697, 2003.

FARKAS, R. Canine babesioses caused by large *Babesia* in Europe, p.83-91. In: BEUGNET, F. (ed), **Guide to major vector-borne diseases of pets**. Merial, France, 2002.

FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K.R., EWING, S.A., MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental

transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.134, p.1-7, 2005.

GAZETA, G. S.; MONTEIRO, A.; ABOUD-DUTRA, A.E. Babesiose felina no Brasil: uma nova espécie? *Anais... Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 13, 2004, Ouro Preto/MG, 2004.

GLAUS, T., HOFMANN-LEHMANN, R., GREENE, C., GLAUS, B., WOLFENBERGER, C., LUTZ, H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* Infection and Correlation with Disease Status in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p. 2883-2885, 1997.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, v.36, p.937-940, 1975.

GUPTILL, L. Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 3-4, 2010.

HSIEH, Y.C., LEE, C.C., TSANG, C.L., CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Veterinary Microbiology*. v.146, p. 70-77, 2010.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites and Vectors*, v.2, p.4, 2009.

KORDICK, D.L., HILYARD, E.J., HADFIELD, T.L. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.1813-18, 1997.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, v.30, p.24-32, 2001.

LAMAS, C.C., MARES-GUIA, M.A., ROZENTAL, T., MOREIRA, N., FAVACHO, A.R.M., BARREIRA, J., GUTERRES, A., BÓIA, M.N., LEMOS, E.R.S. *Bartonella* spp. Infections in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: Serological and molecular study. **Acta Tropica**. v.115, p.137-141, 2010.

MAIA, L. M. P.; CERQUEIRA, A. M. F.; SOUZA, A. M.; MOREIRA, N. S.; SILVA, A. V.; MESSICK, J. B.; FERREIRA, R. F.; ALMOSNY, N. R. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.289-291, 2013.

PEREZ, R. R.; RUBINI, A. S.; O'DWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v.94, p.83-85, 2004.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 410, 2002.

RUBINI, A. S.; DOS SANTOS PADUAN, K.; PEREZ, R. R.; RIBOLLA, P. E.; O'DWYER, L. H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.168-171, 2006.

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; O'DWYER, L.H. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. v.164, p.324–327, 2009.

SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R.G.; JACOBSON, L.S. *et al.* Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. **Journal of South African Veterinary Association**, v.72, n.1, p.4-11, 2001.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v.3, n.4, p.193-209, 2001.

SOARES, C. O. Cytauxzoonose felina é diagnosticada e isolada pela primeira vez na América Latina. **Revista Clínica Veterinária**, v. 32, p. 56-58. 2001.

SOUZA, A.M. Avaliação do hemograma, plaquetometria e da freqüência de *Haemobartonella felis* (FLINT & ROSS, 1953) e de um provável *Theileriidae*, ocorrentes em *Felis catus* (LINNAEUS, 1758) na região do Grande Rio (RJ). 2002. 167f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense – UFF. 2002.

TABAR, M.D., ALTET, L., FRANCINO, O., SÁNCHEZ, A., FERRER, L. & ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, v.151, p. 332-336. 2008.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis, p.722-736. *In: Infectious Diseases of the dog and cat*. St. Louis, 2006.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2788-2793, 2001.

VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D. K.; BANETH, G. Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Small Animals**, v.19, p.51-62, 2003.

WAGNER, J. E.; MOREHOUSE, L. G. Animal susceptibility studies with a *Cytauxzoon* agent of feline origin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 168, n. 9, p. 1135. 1976.

WENYON, C. M. **Protozoology: A Manual for Medical Men Veterinarians and Zoologists**. New York: William Wood, 1085-1095, 1926.

ZHANG, X., LUO, T., KEYSARY, A., BANETH, G., MIYASHIRO, S., STRENGER, C., WANER, T., MCBRIDE, J.W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.15, p.1080–1088, 2008.



# APÊNDICE A

**Detecção molecular de *Bartonella clarridgeiae* em felinos domésticos da região Centro-oeste do Brasil.**

Ísis Assis Braga<sup>a,b</sup>, Ingrid Savino de Oliveira Dias<sup>b</sup>, Cristiane Silva Chitarra<sup>a,c</sup>, Alexandre Mendes Amude<sup>d</sup>, Daniel Moura Aguiar<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

<sup>d</sup> Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

\* Endereço do autor correspondente: Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa, 2367, Boa Esperança, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil. Telefone: +55 65 3615-8662  
Endereço de e-mail: danmoura@ufmt.br (D.M. Aguiar)

## CARTA AO EDITOR

Detecção molecular de *Bartonella clarridgeiae* em felinos domésticos da região Centro-oeste do Brasil.

Prezado Editor,

A Doença da Arranhadura do Gato (DAG) é causada pela *Bartonella henselae*, uma bactéria hemotrófica que infecta humanos, mamíferos domésticos e selvagens. Intimamente relacionada à *B. henselae*, a *B. clarridgeiae* compreende aproximadamente 10% a 30% dos isolados de *Bartonella* encontrados em gatos clinicamente saudáveis e já foi descrita em lesões cardíacas e hepáticas de cães (Kordick et al., 1997). Além do mais, *B. clarridgeiae* tem sido sorologicamente associada à uma doença semelhante a DAG em seres humanos (Breitschwerdt et al., 2000).

Os gatos são considerados os principais reservatórios e portadores de *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*. A *Bartonella* spp. é transmitida através das fezes de pulgas para os gatos susceptíveis. Poucos gatos, naturalmente infectados, apresentam sinais clínicos. Os sintomas associados à infecção por *Bartonella* em gatos são diversos, variando desde febre transitória, linfadenomegalia, abscessos ou microabscessos em diferentes órgãos, endocardites e sinais do sistema nervoso central (Kordick et al., 1997). A transmissão de gatos para humanos e cães ocorrem através de mordidas e arranhões. Em humanos, a infecção pode ser assintomática e pode desaparecer espontaneamente sem tratamentos, entretanto, em alguns casos a doença pode ser fatal, se não tratada (Lamas et al., 2010).

Com o intuito de identificar patógenos transmitidos por artrópodes em felinos domésticos, 182 gatos de diversos recintos dos municípios de Cuiabá e Várzea Grande, ambos localizados no Estado de Mato Grosso, região Centro-Oeste do Brasil, foram analisados. As amostras dos animais foram oriundas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá (UNIC-HV), e de gatis e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Cuiabá e Várzea Grande. As coletas das amostras foram conduzidas de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa em Animais estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência com Animais de Laboratório (SBCAL) e sob o controle

institucional do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT (número de protocolo – UFMT: 23108.017751 / 11-7).

As amostras foram submetidas a extração de DNA usando o Kit comercial Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences, Província de Zhejiang, Hangzhou, China) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi usado como molde para a PCR de *Bartonella* spp., usando os oligonucleotídeos iniciadores: BARTON-1 (5'-TAACCGATATTGGTTGTGTTGAAG-3') e BARTON-2 (5'-TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG-3'), o qual amplifica um segmento de 585-588 pb do gene *Riboflavin synthase C (ribC)* do gênero *Bartonella* (Bereswill et al., 1999).

Três (1,64%) gatos foram positivos para a presença de DNA de *Bartonella* de acordo com a PCR, que objetivou porções de segmentação do gene *ribC*. Sequências parciais de todas as amostras positivas foram geradas, produzindo uma única sequência consenso (Acesso ao GenBank: KR092386) que é idêntica (KC331014; HM588660) e 99% similar (HQ012585; KC331017; KC331014) às correspondentes sequências de *B. clarridgeiae* disponíveis no GenBank.

Todos os gatos positivos foram oriundos do CCZ de Várzea Grande. Habitualmente, esses animais são recolhidos da rua e mantidos no estabelecimento até o momento de adoção. Boulouis et al. observaram que gatos errantes apresentam elevadas prevalências de infecção por *Bartonella* spp. quando comparados aos gatos domiciliados, principalmente devido ao contato próximo entre animais infectados e gatos susceptíveis, demonstrando que a diferença na ocorrência da infecção está associada com o tipo de população felina estudada (Boulouis et al., 2005). Devido ao vigoroso controle de pulgas realizado na população felina, a prevalência de infecção por *Bartonella* spp. em gatos têm reduzido e o risco de doenças associadas à *Bartonella* em seus proprietários também diminuiu. No entanto, os proprietários de felinos e os profissionais de saúde animal devem ser advertidos para evitar comportamentos que aumentem o risco de mordidas e/ou arranhões dos animais, uma vez que, a população felina age como fonte de agentes zoonóticos e representam um risco potencial de infecção (Kordick et al., 1997).

No Brasil, a ocorrência de infecção por *Bartonella* em humanos já foram relatadas. No Estado do Rio de Janeiro, 41,6% de pacientes positivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que estavam clinicamente assintomáticos, foram descritos como soropositivos para *Bartonella* spp. (Lamas et al., 2010). Deste modo,

os médicos da saúde animal e humana devem considerar a presença desse patógeno zoonótico em seus diagnósticos de rotina.

#### Agradecimentos

Agradecemos as bolsas de estudos concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato (FAPEMAT) à IAB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a ISOD e DMA. Agradecemos também todo o suporte oferecido por Valeria Dutra e Luciano Nakazato pelos recursos laboratoriais disponíveis.

#### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KORDICK, D.L., HILYARD, E.J., HADFIELD, T.L., WILSON, K.H., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J., BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p.1813-18, 1997.

BREITSCHWERDT, E.B., KORDICK, D.L. Bartonella infection in Animals: Carriership, Reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, p. 428-38. 2000.

LAMAS, C.C., MARES-GUIA, M.A., ROZENTAL, T., MOREIRA, N., FAVACHO, A.R.M., BARREIRA, J., GUTERRES, A., BÓIA, M.N., LEMOS, E.R.S. *Bartonella* spp. Infections in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: Serological and molecular study. **Acta Tropica**. v.115, p.137-141, 2010.

BERESWILL, S., HINKELMANN, S., KIST, M., SANDER, A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for

differentiation of *Bartonella* species by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3159- 3166, 1999.

BOULOUIS, H.J., CHANG, C.C., HENN, J.B., KASTEN, R.W., CHOMEL, B.B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. **Veterinary Research**. v.36, p. 383–410. 2005.

# APÊNDICE B

## **Detecção molecular de protozoários parasitas transmitidos por carrapatos em gatos domésticos do Centro-Oeste do Brasil**

Molecular detection of tick-borne protozoan parasites in a population of domestic cats in midwestern Brazil

Ísis Assis Braga<sup>1,2</sup>, Dirceu Guilherme de Souza Ramos<sup>1,3</sup>, Arlei Marcili<sup>4,5</sup>, Andréia Lima Tomé Melo<sup>1,6</sup>, Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques<sup>1,7</sup>, Alexandre Mendes Amude<sup>6</sup>, Cristiane Silva Chitarra<sup>1,7</sup>, Luciano Nakazato<sup>7</sup>, Valéria Dutra<sup>7</sup>, Richard de Campos Pacheco<sup>7</sup>, Daniel Moura Aguiar<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Mineiros, 75830-000. Mineiros, GO, Brasil.

<sup>3</sup> Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, 758000-000. Jataí, GO, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, 05508-270. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Santo Amaro, 04829-900. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

<sup>7</sup> Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil

\* Endereço do autor correspondente: Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa, 2367, Boa Esperança, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil. Telefone: +55 65 3615-8662, Endereço de E-mail: danmoura@ufmt.br (D.M. Aguiar)



## **BREVE COMUNICAÇÃO**

### **Resumo**

Alguns patógenos transmitidos por carrapatos que infectam gatos domésticos têm sido considerados emergentes na medicina veterinária. A ocorrência de *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *Cytauxzoon* spp. têm sido descrita em diversas regiões do Brasil. Este trabalho oferece uma análise abrangente do gene 18S rRNA do isolado de *Hepatozoon* sp. detectado em gatos domésticos da região metropolitana de Cuiabá, Centro-Oeste do Brasil. Baseados e análises moleculares, detectamos a presença de espécies de *Hepatozoon* circulando entre os gatos desta região. A cepa, mencionada acima, está intimamente relacionada a outros isolados de *H. felis* detectados em felídeos selvagens no Brasil. Além do mais, análise filogenética indicou que o genótipo deste isolado está classificado em um clado do gene 18S rRNA previamente descrito para o gênero *Hepatozoon* em felídeos selvagens ao redor do mundo. Isolados de *H. felis* detectados em gatos da Espanha e Israel foram 98% e 97% similar à nossa sequência e estão agrupados em um clado separado na árvore filogenética. Este achado sugere uma alta diversidade de genótipos de *Hepatozoon* ocorrendo na Europa e na América do Sul. Nenhum dos gatos avaliados foram positivos para *Babesia* spp. ou *Cytauxzoon* spp. por meio de análise de PCR.

Palavras-chave: Infecções hemoparasitárias felinas, *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp.

### **Abstract**

Some tick-borne pathogens that infect domestic cats have been considered emergent in veterinary medicine. Occurrences of *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. and *Cytauxzoon* spp. have been described in several regions of Brazil. This paper offers a comprehensive analysis of the 18S rRNA gene of a *Hepatozoon* sp. strain detected in domestic cats in the metropolitan area of Cuiabá, in midwestern Brazil. Based on a molecular analysis, we detected the presence of *Hepatozoon* species circulating among cats in this region. The aforementioned strain is closely related to other isolates of *H. felis* detected in wild felids in Brazil. Moreover, a phylogenetic analysis indicates that this

genotype is grouped into a clade of 18S rRNA genes previously described for the genus *Hepatozoon* in wild felids around the world. *Hepatozoon felis* strains detected in cats from Spain and Israel were 98% and 97% similar to our sequence and are clustered on a separate branch of the phylogenetic tree. This finding suggests a high diversity of *Hepatozoon* genotypes occurring in Europe and South America. None of the analyzed cats were positive for *Babesia* spp. or *Cytauxzoon* spp. by PCR analysis.

Keywords: Feline hemoparasitic infections, *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp.

## Introdução

Hepatozoonose, babesiose e cytauxzoonose felina são doenças causadas por protozoários transmitidos por carrapatos, frequentemente associadas à distúrbios hematológicos relatados em gatos domésticos no Brasil (Criado-Fornelio et al., 2006; André et al., 2009; Bortoli et al., 2011; Maia et al., 2013; Baneth et al., 2013, Filoni et al., 2013, André et al., 2014, André et al., 2015).

*Hepatozoon* sp. são parasitas apicomplexos caracterizados pelo ciclo de vida heteroxeno, o qual é transmitido a uma ampla variedade de hospedeiros intermediários, através de ingestão de artrópodes hematófagos contendo oocistos maduros (Baneth et al., 1998). Estudos baseados em caracterização molecular do gênero *Hepatozoon* em felídeos domésticos e selvagens, tem-se demonstrado que mais de uma espécie pode estar associado com a ocorrência da infecção em felinos (Criado-Fornelio et al., 2006; Baneth et al., 2013). Uma nova espécie de *Hepatozoon*, geneticamente distinta do *H. canis*, foi caracterizada em gatos do Sul da Espanha (Criado-Fornelio et al., 2006). Por outro lado, um recente estudo, reavaliou a espécie *H. felis* baseado em análise filogenética e morfológica, sugerindo que felinos são primeiramente infectados por esta espécie, a qual tem predileção por infectar tecido muscular (Baneth et al., 2013).

*Cytauxzoon felis* é um patógeno relativamente novo, e tem sido considerado historicamente fatal (Wagner, 1976; Maia et al., 2013). Na fase aguda da infecção em gatos domésticos, o curso da doença é rápido e muitos gatos morrem dentro de uma semana após o início dos sintomas clínicos. A esporádica ocorrência, o curso rápido da doença e o histórico de alta taxa de mortalidade da cytauxzoonose em gatos domésticos sugere que eles provavelmente atuam como hospedeiros terminais (Greene et al., 2006).

A espécie de *Babesia* sp. relatada no Brasil está intimamente relacionada a *B. vogeli* (André et al., 2009). Recentemente, André et al. (2015) descreveram a presença de DNA de *Babesia* muito próxima a espécies de *B. bigemina* e *Theileria* spp., comumente detectadas em ruminantes, circulando em gatos domésticos no Brasil. Babesiose felina está associada com anorexia, perda de peso, alterações gastrointestinais, anemia, trombocitopenia, leucocitose ou

leucopenia e icterícia (Criado-Fornelio, 2012). *Babesia* e *Cytauxzoon* têm sido descritos, por meio de análises moleculares e sorológicas em felinos domésticos e selvagens nas regiões centro-sul e sudeste do Brasil (André et al., 2011, André et al., 2015).

Considerando a literatura revisada, o presente estudo objetivou avaliar os gatos domésticos da região metropolitana de Cuiabá, centro-oeste do Brasil, com intuito de detectar a presença de protozoários hemoparasitas transmitidos por carrapatos. Este trabalho apresenta a primeira descrição e a análise filogenética do gene 18S rRNA de um genótipo intimamente relacionado a espécies de *H. felis*, detectados em gatos de Cuiabá.

### **Material e Métodos**

O estudo foi realizado nas cidades de Cuiabá (15°35'56"S 56°06'01'O), capital do estado de Mato Grosso, e Várzea Grande (15°38'49"S; 56°07'58"O), ambas localizadas no centro-oeste do Brasil. Entre maio de 2011 e julho de 2013, foram coletados em tubos com EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) amostras de sangue de 180 gatos domésticos do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá (UNIC-HV), e de gatis e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Cuiabá e Várzea Grande. As amostras de sangue foram refrigeradas a -20°C até a realização dos testes. As coletas das amostras foram conduzidas de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa em Animais estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência com Animais de Laboratório (SBCAL) e sob o controle institucional do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT (número de protocolo – UFMT: 23108.017751 / 11-7).

As amostras foram submetidas a extração de DNA usando o Kit comercial Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences, Província de Zhejiang, Hangzhou, China) de acordo com as instruções do fabricante. De forma a avaliar e assegurar a presença de DNA genômico nas amostras, o gene endógeno felino, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), foi avaliado em 20% das amostras por meio de PCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F-370 (5'-CAGCAACTCCCCTCTTCCACCT-3') e GAPDH-R-369 (5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCGT-3') para obter um fragmento de 120 pb (este

artigo), seguindo o protocolo: 2,5 µl de solução tampão (Sigma ®), 1.0 µl de DNTTP (0.2 mM), 0.5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (20 pmol/µl), 0.1 µl de Taq Polimerase, 2.0 µl de DNA e 19.5 µl de água ultra pura livre de nucleases (*Nuclease-Free Water*), com o volume final da reação de 25µl. O protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação (94°C, 30s), anelamento (60°C, 30s), extensão (72°C, 30s), e uma extensão final de 72°C for 7 min.

O DNA foi utilizado como molde para a PCR de *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *Cytauxzoon* spp. usando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: HEP144-169 (5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3') e HEP743-718 (5'-ACAATAAAGTAAAAACA-3'), o qual amplifica um fragmento de 574-pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp. (Almeida et al., 2013), BAB143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') e BAB694-667 (5'-GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3'), amplificando um segmento de 551 pb do gene 18S rRNA de *Babesia* spp. (Perez et al., 2013) e CYTAUX-F (5'-GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3') e CYTAUX-R (5'-CCAAATGATACTCCGGAAAGAG-3'), que amplifica um fragmento de 284-300 pb do gene 18S rRNA de *Cytauxzoon* spp. (Birkenheuer et al., 2006). A fim de se obter um amplo fragmento amplificado do gene 18S rRNA de *Hepatozoon*, as amostras positivas da primeira reação foram submetidas à uma segunda reação usando os oligonucleotídeos iniciadores HAM-1 (5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTC-3') e HPF-2 (5'-GACTTCTCCTTCGTCTAAG-3'), com o intuito de amplificar um fragmento de 1750 pb (Criado-Fornelio et al., 2006). DNA genômico de *Babesia* e *Hepatozoon* oriundo de cães naturalmente infectados (Spolidorio et al., 2011) e amostra de DNA de *Cytauxzoon*, gentilmente cedido por R.Z. Machado, foram utilizados como controle positivo nas reações.

Os produtos amplificados foram purificados com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Bio-Sciences, USA) segundo instruções do fabricante, em seguida, submetidos ao sequenciamento genético utilizando Big Dye (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, em sequenciador automático de DNA modelo ABI PRISM-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Perkin, Elmer Foster City, CA). As sequências obtidas foram editadas no software BioEdit (Ibis Biosciences,

Carlsband, CA) e posteriormente analisada através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a fim de verificar a identidade com demais sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

Sequências parciais do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* (1528 pb) geradas por meio da segunda reação de PCR para *Hepatozoon* foram alinhadas através do ClustalX (Thompson et al. 1997) e ajustadas manualmente usando o software Genedoc (Nicholas et al. 1997) com as correspondentes sequências disponíveis no Genbank.

O alinhamento do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* incluiu 32 sequências diferentes (449 caracteres). A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima parcimônia, usando o software PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), com 1.000 repetições de taxa; Todas as posições foram igualmente ponderadas. A análise bayesiana também foi realizada, usando o software MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) com quatro corridas de cadeia de Markov independentes para 1.000.000 dados acopladas às gerações MCMC, amostrando uma árvore a cada 100ª geração. Os primeiros 25% das árvores representaram burn-in, e as árvores restantes foram usadas para calcular a probabilidade posterior Bayesiana. *Babesia* sp. (AF188001) foi incluída como grupo externo na árvore filogenética.

## Resultados

Nenhum dos gatos analisados foram positivos para *Babesia* spp. ou *Cytauxzoon* spp. através da PCR. Do total de animais avaliados, 3 (1,66%) gatos machos, adultos e oriundos do CZZ de Várzea Grande apresentaram DNA de *Hepatozoon* spp. (Tabela 1). As sequências geradas de 1528 pb do gene 18S rRNA foram mutuamente idênticas (100%) e uma sequência de nucleotídeos consensual demonstrou identidade variando de 93% a 99%, de acordo com diferentes espécies e isolados de *Hepatozoon* spp. relatadas em diversas regiões ao redor do mundo (Tabela 2).

A sequência de nucleotídeos do *Hepatozoon* sp. detectado neste estudo, foi analisada e representada na árvore filogenética demonstrada na Figura 1. A Máxima Parcimônia e a árvore Bayesianas foram congruentes, e baseado nos

valores de *bootstrap*, as sequências de *Hepatozoon* sp. podem ser segregadas em pelo menos seis clados diferentes, os quais, para o propósito deste estudo, foram designados como A, B, C, D, E e F (Tabela 2). O clado A, é composto por grupos de isolados de *H. canis* detectados em cães domésticos e selvagens, bem como em gatos domésticos também. O clado B, por grupos de *H. felis* detectados em gatos domésticos da Espanha e Israel. Clado C, compreende diferentes isolados de *Hepatozoon* detectados em roedores e répteis, e o clado D é composto por espécies detectadas em marsupiais. Diferentes isolados de *H. americanum* foram identificados do clado E. A espécie de *Hepatozoon* detectada neste estudo, denominada isolado Cuiabá, foi posicionada próximo aos isolados detectados em felídeos selvagens, no clado F (Figura 1). A sequência do gene 18S rRNA do *Hepatozoon*, isolado Cuiabá, foi depositado no GenBank (acesso: KM435071).

## Discussão

O trabalho relata a primeira detecção de *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos da região metropolitana de Cuiabá, centro-oeste do Brasil, e descreve uma análise filogenética baseada em sequências de nucleotídeos do gene 18S rRNA do genótipo descrito neste trabalho, denominado, isolado Cuiabá. Um estudo anterior, nesta mesma região, falhou em detectar a presença de *Hepatozoon* sp. em amostras sanguíneas de gatos domésticos de abrigos, bem como, de animais atendidos em Hospital Veterinário (Miceli et al., 2013). A sequência gerada (1528 pb) dos três gatos positivos demonstraram uma estreita relação com isolados de *Hepatozoon* spp. detectados em felinos selvagens do Brasil, Índia e Japão. Este achado, demonstra que os isolados brasileiros pertencem a um único clado, constituído por genótipos detectados em *Leopardus pardalis* e *Felis catus domestica*, sendo esta afirmação amparada pelo valor substancial de bootstrap (92%). No entanto, o valor de bootstrap observado na árvore filogenética, além de dar suporte a analogia observada entre *Hepatozoon* spp. de felinos selvagens e o isolado Cuiabá, demonstra também a distância entre o clado composto por *H. felis*, anteriormente detectado em gatos domésticos da Espanha e Israel, em relação ao isolado deste estudo (Figura 1, Tabela 2).

Os resultados deste, demonstram claramente que o genótipo de *Hepatozoon*, isolado Cuiabá, pertence a um clado diferente do *H. canis* detectado em cães e gatos do Brasil. Este achado, contradiz a hipótese de Rubini et al., (2006), de que um pequeno grau de divergência entre os isolados de *H. felis* e *H. canis* não eram suficientes para diferenciar as espécies ocorridas em felinos. Além do mais, Tabar et al., (2008) sugeriram que a hepatozoonose felina ocorria a maioria das vezes em regiões onde a infecção canina também estava presente. De fato, apesar da divergência entre o *H. canis* e o isolado Cuiabá em felinos deste estudo, um estudo anteriormente conduzido na mesma região, detectou *H. canis* circulando em cães domésticos atendidos em dois Hospitais Veterinários (Spolidorio et al., 2011).

Além disso, a classificação de isolados distintos em pelo menos 6 clados, indicaram uma estreita relação entre diferentes genótipos de *Hepatozoon* e



outras espécies detectadas em animais selvagens (Tabela 2), o que inclui genótipos de *H. americanum*, que é um importante hemoparasita de cães da América do Norte e de alguns pequenos mamíferos. Por outro lado, isolados denominados *H. felis* (clado B) detectados em gatos domésticos da Espanha e Israel foram agrupados em um clado separado das sequências do isolado Cuiabá (clado F). Coincidentemente, este grupo foi segregado com espécies que ocorrem na região Mediterrânea, compreendendo partes da Europa e Oriente Médio.

A relação evolutiva proposta neste estudo destaca a diversidade e origem polifilética do *H. felis*. As sequências de espécies diferentes e isolados novos devem ser inclusos no estudo filogenético, a fim de elucidar e validar os grupos monofiléticos de *Hepatozoon*. A posição dos genótipos do clado C a F sugere que *Hepatozoon* também pode ser segregado por meio de hospedeiros, o que está representado pelas diferentes espécies de animais selvagens. Um genótipo estreitamente relacionado a *Hepatozoon* sp. Curupira-2 e *H. americanum* foi descrito por André et al. (2010) em carnívoros selvagens mantidos em cativeiro na região Centro-Oeste do Brasil. Curiosamente, a relação e a proximidade observada entre espécies de roedores, marsupiais, répteis e felinos suporta a possibilidade de que populações de carrapatos infectados sejam compartilhados ou a possibilidade pertinente de transmissão via predação. Por exemplo, o *Hepatozoon* sp., isolado Cuiabá, foi alocado dentro de um clado estreitamente relacionado ao *H. americanum*, o qual foi experimentalmente transmitido a um cão, através da predação de roedores selvagens e coelhos portadores dos estádios de cisto teciduais deste parasita (Johnson et al., 2009a, 2009b).

As espécies de *Hepatozoon*, descritas por apresentarem baixa virulência em felinos, atuam como parasitas oportunistas, infectando animais imunossuprimidos ou através de infecção latente em tecidos de gatos aparentemente saudáveis (Baneth et al., 1998; Baneth et al., 2013). De fato, a infecção latente, pode ser a razão pela escassa ocorrência de infecção por *Hepatozoon* sp. em gatos, o que colabora com demais pesquisas conduzidas em outros países (Baneth et al., 1998; Criado-Fornelio et al., 2006). A baixa frequência de parasitismo por carrapatos em gatos também contribui para o menor número de casos de infecção, uma vez que, estes artrópodes são

indicados como vetor de *Hepatozoon* sp. entre os carnívoros (Demoner et al., 2013).

Miceli et al. (2013) descreveram anteriormente, na mesma região deste estudo, a ausência de infecção por *Hepatozoon* em gatos oriundos de abrigos. No entanto, a atual pesquisa envolveu um número amostral de gatos mais abrangente, compreendendo animais de dois Hospitais Veterinários, dois abrigos de gatos e dois Centros de Controle de Zoonoses (departamento governamental responsável pela captura de cães e gatos de rua). Além do mais, os felinos positivos neste estudo eram oriundos do CCZ do município de Várzea Grande, sugerindo que gatos de rua são mais susceptíveis à infecção do que os gatos domiciliados. Estes animais errantes podem causar sérios problemas para a população onde vivem, atuando como portadores de alguns patógenos.

A região estudada é caracterizada pela alta incidência de animais errantes, e alta densidade de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Almeida et al., 2012), o qual é considerado suspeito de ser o vetor do *H. canis* em ambientes urbanos (Baneth et al., 2007). Por outro lado, Demoner et al. (2013) não observaram formas parasitárias de *H. canis* em carrapatos *R. sanguineus*, após o repasto sanguíneo em cães naturalmente infectados, a contar deste modo, o vetor definitivo de *Hepatozoon* spp. em cães e gatos no ambiente urbano do Brasil é incerto, sendo necessária maiores investigações.

Todos os gatos positivos neste estudo eram machos, e outras pesquisas também observaram uma maior tendência de infecção por *Hepatozoon* em gatos machos do que em fêmeas (Baneth et al., 1998; Perez et al., 2004). O comportamento territorial agressivo dos felinos machos pode ser um fator predisponente ao parasitismo por carrapatos infectados, e particularmente por infecções por patógenos imunossupressores como o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), os quais favorecem a propagação da infecção por *Hepatozoon* (Baneth et al., 1998).

Embora nenhuma das amostras testadas tenham sido positivas para *Babesia* spp. e *Cytauxzoon* spp. neste estudo, infecções por estes agentes têm sido reportadas em gatos. Recentemente, André et al. (2014, 2015) relataram através detecção molecular um genótipo de *Babesia* estreitamente relacionada

a *B. vogeli* circulando em gatos errantes no zoológico do estado de São Paulo e em gatos domiciliados e não domiciliados do estado de Mato Grosso do Sul. Este tipo de ambiente contribui para a transmissão de agentes de carnívoros selvagens, mantidos em cativeiro, para gatos errantes através de vetores artrópodes ou vice-versa. Além do mais, Maia et al. (2013) descreveram a primeira detecção molecular de *C. felis* em gatos domésticos no Sudeste do Brasil, e posteriormente, André et al., (2015) também relataram detecção molecular em gatos domésticos no Centro-Oeste do Brasil. Portanto, maiores estudos sobre patógenos transmitidos por artrópodes em felinos domésticos são necessários, a fim de se obter uma melhor compreensão da epidemiologia dos agentes relacionados.

## **Conclusão**

Este estudo demonstrou que gatos domésticos da região metropolitana de Cuiabá, Centro-oeste do Brasil, foram expostos a um genótipo intimamente relacionado ao *Hepatozoon* sp., anteriormente descrito em felídeos selvagens. Pesquisas adicionais são necessárias para caracterizar as diferentes espécies de *Hepatozoon* que podem estar infectando felídeos. Além disso, maiores estudos fazem-se necessários a fim de elucidar a diversidade genotípica de espécies de *Hepatozoon* em diferentes regiões do mundo, uma vez que, diferentes isolados podem expressar novos fenótipos, resultando assim em diferentes formas de manifestação da doença.

## **Agradecimentos**

Agradecemos as bolsas de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a IA Braga, ALT Melo, IGG Taques, CS Chitarra e DGS Ramos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos subsídios para a produtividade científica atribuídas a V Dutra, L Nakazato, RC Pacheco e DM Aguiar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.B.P.F., PAULA, D.A.J., DAHROUG, M.A.A., FREITAS, A.G., SILVA, J.N., DUTRA, V., NAKAZATO, L., SOUSA, V.R.F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 23, p.1123-1126, 2012.

ALMEIDA, A.P., SOUZA, T.D., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**. v. 50, p. 640–646, 2013.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, p. 403-410, 1990.

ANDRÉ, M.R., ADANIA, C.H., MACHADO, R.Z., ALLEGRETTI, S.M., FELIPPE, P.A.N., SILVA, K.F., NAKAGHI, A.C.H., DAGNONE, A.S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of wildlife diseases**. v.45, p. 234-237, 2009.

ANDRÉ, M.R., ADANIA, C.H., TEIXEIRA, R.H., VARGAS, G.H., FALCADE, M., SOUSA, L., SALLES, A.R., ALLEGRETTI, S.M., FELIPPE, P.A., MACHADO, R.Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**. v.173, p.134–138, 2010.

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

ANDRÉ, M.R., DENARDI, N.C.B., SOUSA, K.C.M., GONÇALVES, L.R., HENRIQUE, P.C., ONTIVERO, C.R.G.R., GONZÁLES, I.H.L., NERY, C.V.C., CHAGAS, C.R.F., MONTICELLI, C., SANTIS, A.C.G.A., MACHADO, R.Z.

Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v.5, p.545–551, 2014.

ANDRÉ, M.R., HERRERA, H.M., DE JESUS FERNANDES, S., DE SOUSA, K.C., GONÇALVES, L.R., DOMINGOS, I.H., DE MACEDO, G.C., MACHADO, R.Z. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v.6, p.779-86, 2015.

BANETH, G., AROCH, I., TAL, N., HARRUS, S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. **Veterinary Parasitology**. v.79, p.123-133, 1998.

BANETH, G., SAMISH, M., SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (apicomplexa: adeleorina: hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*canis familiaris*). **Journal of Parasitology**. v.93, p.283-299, 2007.

BANETH, G., SHEINER, A., EYAL, O., HAHN, S., BEAUFILS, J.P., ANUG, Y., TALMI-FRANK, D. Redescription of *Hepatozoon felis* (apicomplexa: hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. **Parasites & Vectors**. v.6, p.120, 2013.

BIRKENHEUER, A.J., LE, J.A., VALENZISI, A.M., TUCKER, M.D., LEVY, M.G., BREITSCHWERDT, E.B. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid- Atlantic states: 34 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.228, p.568 – 571, 2006.

BORTOLI, C.P., ANDRÉ, M.R., BRAGA, M.DO S., MACHADO, R.Z. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. in cats from São Luís Island, Maranhão, Northeastern Brazil. **Parasitology Research**. v.109, p.1189-1192, 2011.

CARRENO, R.A., MARTIN, D.S., BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**. v.85, p.899-904,1999.

CRIADO-FORNELIO, A., RUAS, J.L., CASADO, N., FARIAS, N.A., SOARES, M.P., MÜLER, G., BRUMT, J.G., BERNE, M.E., BULING- SARANÃ, A., BARBA-CARRETERO, J.C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **International Journal for Parasitology**. v.92, p.93-99, 2006.

CRIADO-FORNELIO, A., BULING, A., CASADO, N., GIMENEZ, C., RUAS, J., WENDT, L., DA ROSA-FARIAS, N., PINHEIRO, M., REY-VALEIRON, C., BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**. v.54, p.187-193, 2009.

CRIADO-FORNELIO, A. Emerging tick-borne protozoal disease: Part 1. New advances in diagnosis, epizootiology and taxonomy of feline piroplasmids. **Felines**. v.2, p.31–66, 2012.

DEMONER, L. DE C., RUBINI, A.S., PADUAN, K.S., METZGER, B., DE PAULA ANTUNES, J.M., MARTINS, T.F., MATHIAS, M.I., O'DWYER, L.H. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v.4, p.542-546, 2013.

HABER, M.D., TUCKER, M.D., MARR, H.S., LEVY, J.K., BURGESS, J., LAPPIN, M.R., BIRKENHEUER, A.J. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. **Veterinary Parasitology**. v.146, p.316–320, 2007.

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**. v.17, p.754–755, 2001.

FILONI, C., CATÃO-DIAS, J.L., CATTORI, V., WILLI, B., MELI, M.L., RAMIRO CORRÊA, S.H., MARQUES, M.C., ADANIA, C.H., SILVA, J.C.R., MARVULO, M.F.V., FERREIRA NETO, J.S., DURIGON, E.L., CARVALHO, V.M., COUTINHO, S.D., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.24, p.166-173, 2012.

GREENE, C.E., MEINKOTH, J., KOCAN, A.A. Cytauxzoonosis. In: Greene, C.E. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 3rd ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, p.722–733, 2006.

JOHNSON, E.M., PANCIERA, R.J., ALLEN, K.E., SHEETS, M.E., BEAL, J.D., EWING, S.A., LITTLE, S.E. Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.23, p.1315-131, 2009.

JOHNSON, E.M., ALLEN, K.E., PANCIERA, R.J., EWING, S.A., LITTLE, S.E. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology**. v.164, p.162-166, 2009.

MAIA, L.M.P., CERQUEIRA, A.M.F., MACIEIRA, D.B., SOUZA, A.M., MOREIRA, N.S., SILVA, A.V., MESSICK, J.B., FERREIRA, R.F., ALMOSNY, N.R.P. *Cytauxzoon felis* an 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, p.289-291, 2013.

MATHEW, J.S., VAN DEN BUSSCHE, R.A., EWING, S.A., MALAYER, J.R., LATHA, B.R., PANCIERA, R.J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **Journal of Parasitology**. v.86, p.366-372, 2000.

MEINKOTH, J., KOCAN, A.A., WHITWORTH, L., MURPHY, G., FOX, J.C., WOODS, J.P. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.14 p.521–525, 2000.

MERINO, S., VASQUEZ, R., MARTINEZ, J., CELIS-DIEZ, J.L., GUTIERREZ-JIMENEZ, L., IPPI, S., SANCHEZ-MONSALVEZ, I., MARTINEZ DE LA PUENTE, J. Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the 'living fossil' marsupial 'Monito del Monte' *Dromiciops gliroides* from Chile. **Biological Journal of the Linnean Society**. v.98, p.568-576, 2009.

METZGER, B., DOS SANTOS PADUAN, K., RUBINI, A.S., DE OLIVEIRA, T.G., PEREIRA, C., O'DWYER, L.H. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.152, p.28-33, 2008.

MICELI, N. G., GAVIOLI, F.A., GONÇALVES, L.R., ANDRÉ, M.R., SOUSA, V.R.F., SOUSA, K.C.M., MACHADO, R.Z., Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá. State of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, p.385-390, 2013.

NICHOLAS, K.B., NICHOLAS JR., H.B., DEERFIELD, D.W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Embnew News**. v.4, p.14, 1997.

PAWAR, R.M., POORNACHANDAR, A., SRINIVAS, P., RAO, K.R., LAKSHMIKANTAN, U., SHIVAJI, S. Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. **Veterinary Parasitology**. v.25, p.475-479, 2012.

PEREZ, R.R., RUBINI, A.S., O'DWYER, L.H. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**. v.94, p.83-85, 2004.



RUBINI, A.S., DOS SANTOS PADUAN, K., PEREZ, R.R., RIBOLLA, P.E., O'DWYER, L.H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.137, p.168-171, 2006.

SAKUMA, M., NISHIO, T., NAKANISHI, N., IZAWA, M., ASARI, Y., OKAMURA, M., SHIMOKAWA MIYAMA, T., SETOGUCHI, A., ENDO, Y. A Case of Iriomote Cat (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) with *Hepatozoon felis* Parasitemia. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.73, p.1381-1384, 2011.

SLOBODA, M., KAMLER, M., BULANTOVA, J., VOTYPKA, J., MODRY, D. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. **Journal of Parasitology**. v.93, p.1189-1198, 2007.

SPOLIDORIO, M.G., TORRES, M.M., CAMPOS, W.N.S., MELO, A.L.T., IGARASHI, M., AMUDE, A.M., LABRUNA, M.B., AGUIAR, D.M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.20, p.253-255, 2011.

SWOFFORD, D.L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. **Beta Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, USA: sinauer and Associates**. 2002.

TABAR, M.D., ALTET, L., FRANCINO, O., SÁNCHEZ, A., FERRER, L., ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**. v.151, p.332-336, 2008.

TATENO, M., NISHIO, T., MATSUO, T., SAKUMA, M., NAKANISHI, N., IZAWA, M., ASARI, Y., OKAMURA, M., SHIMOKAWA MIYAMA, T., SETOGUCHI, A., ENDO, Y. Epidemiological survey of tick-borne protozoal infection in iriomote cats and tsushima leopard cats in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.31, p.985-989, 2013.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTAL\_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v.25, p.4876-4882, 1997.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology And Evolution**. v. 28, p.2731–2739, 2011.

VILCINS, I.M., UJVARI, B., OLD, J.M., DEANE, E. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. **Journal of Parasitology**. v.95, p.434-442, 2009.

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

# APÊNDICE C

Tabela 1. Número de amostras sanguíneas de gatos por localidade, idade e sexo, avaliadas por meio de PCR para a detecção de *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *Cytauxzoon* spp. no Centro-Oeste do Brasil.

Localidade	Idade		Sexo		N Total (%)
	Jovem	Adulto	Macho	Fêmea	
HOVET-UFMT	1	10	9	2	11 (6.1)
HV-UNIC	4	22	15	11	26 (14.4)
Gatil 1	1	30	14	17	31 (17.2)
Gatil 2	3	15	8	10	18 (10)
CCZ-CBA	8	21	16	13	29 (16.1)
CCZ-VG	34	31*	30*	35	65 (36.2)*
Total	51	129	92	88	180 (100)

\* Três machos adultos foram positivos na PCR para *Hepatozoon*. Frequência de 1.6%.

HOVET-UFMT – Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso

HV-UNIC – Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá

CCZ-CBA – Centro de Controle de Zoonoses de Cuiabá

CCZ-VG – Centro de Controle de Zoonoses de Várzea Grande

Tabela 2. Isolados de *Hepatozoon* sp. divididos de acordo com clados e relacionados com espécies hospedeiras e localidade de detecção.

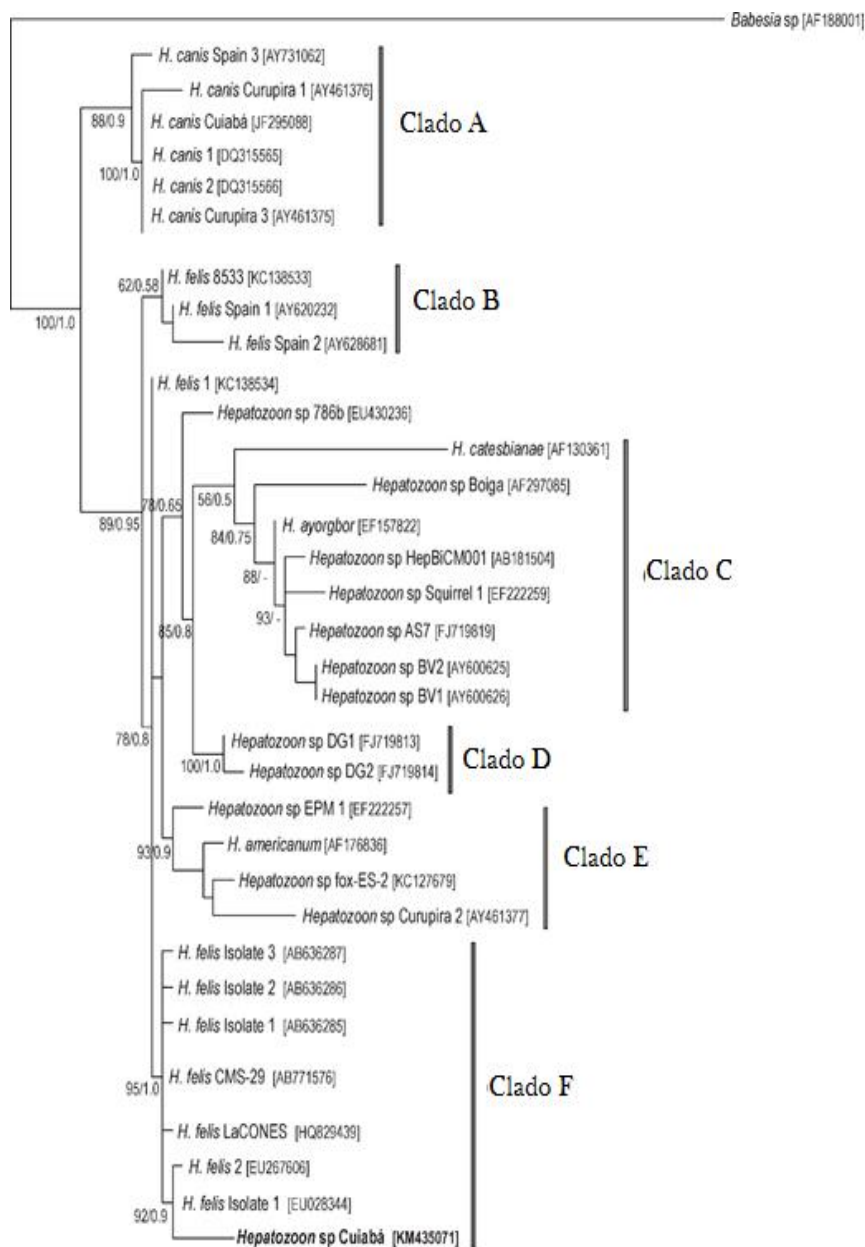
Clados	Isolado (acesso ao genbank)	%	Espécie hospedeira	País	Continente	Referências
A	<i>H. canis</i> Cuiabá (JF295088)	96	<i>Canis familiaris</i>	Brasil	América do Sul	Spolidorio et al. (2011)
	<i>H. canis</i> CAT 1 (DQ315565)	96	<i>Felis catus domesticus</i>	Brasil	América do Sul	Rubini et al. (2006)
	<i>H. canis</i> CAT 2 (DQ315566)	96	<i>Felis catus domesticus</i>	Brasil	América do Sul	
	<i>H. canis</i> Curupira 3 (AY461375)	98	<i>Dusicyon thous</i>	Brasil	América do Sul	Criado-Fornelio et al. (2006)
	<i>H. canis</i> Spain 3 (AY731062)	97	<i>Vulpes vulpes</i>	Espanha	Europa	Criado-Fornelio et al. (2003)
	<i>H. canis</i> Curupira 1 (AY461376)	98	<i>Pseudolapex gymnocercus</i>	Brasil	América do Sul	Criado-Fornelio et al. (2006)
B	<i>H. felis</i> Israel 8533 (KC138533)	97	<i>Felis catus domesticus</i>	Israel	Asia	Baneth et al. (2013)
	<i>H. felis</i> Spain 2 (AY628681)	98	<i>Felis catus domesticus</i>	Israel	Asia	Criado-Fornelio et al. (2006)
	<i>H. felis</i> Spain 1 (AY620232)	98	<i>Felis catus domesticus</i>	Espanha	Europa	
-	<i>H. felis</i> Israel 1 (KC138534)	97	<i>Felis catus domesticus</i>	Espanha	Europa	Baneth et al. (2013)
-	<i>Hepatozoon</i> sp. 786b (EU430236)	96	<i>Amblyomma fimbriatum</i>	Austrália	Oceania	Vilcins et al. (2009)
C	<i>H. catesbiana</i> e (AF130361)	93	-			Carreno et al. (1999)
	<i>Hepatozoon</i> sp. Boiga (AF297085)	95	<i>Boiga irregularis</i>	Austrália	Oceania	*
	<i>H. ayorgbor</i> (EF157822)	97	<i>Phyton regius</i>	Gana	África	Sloboda et al. (2007)
	<i>Hepatozoon</i> sp. HepBiCM001 (AB181504)	97	<i>Bandicota indica</i>	Tailândia	Àsia	*
	<i>Hepatozoon</i> sp. Squirrel 1 (EF222259)	95	<i>Sciurus vulgaris</i>	Espanha	Europa	Criado-Fornelio et al. (2009)
	<i>Hepatozoon</i> sp. AS7 (FJ719819)	97	<i>Abrothrix sanborni</i>	Chile	América do Sul	Merino et al. (2009)
	<i>Hepatozoon</i> sp. BV1 (AY600625)	97	<i>Clethrionomys glareolus</i>	Espanha	Europa	Criado-Fornelio et al. (2006)

	<i>Hepatozoon</i> sp. BV2 (AY600626)	97	<i>Clethrionomys glareolus</i>	Espanha	Europa	
D	<i>Hepatozoon</i> sp. DG1 (FJ719813)	98	<i>Dromiciops gliroides</i>	Chile	América do Sul	Merino et al. (2009)
	<i>Hepatozoon</i> sp. DG2 (FJ719814)	98	<i>Dromiciops gliroides</i>	Chile	América do Sul	
E	<i>Hepatozoon</i> EPM 1 (EF222257)	98	<i>Martes martes</i>	Espanha	Europa	Criado-Fornelio et al. (2009)
	<i>H. americanum</i> (AF176836)	97	<i>Amblyomma maculatum</i>	EUA	América do Norte	Mathew et al. (2000)
	<i>Hepatozoon</i> sp. fox-ES2 (KC127679)	97	<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	América do Sul	Almeida et al. (2013)
	<i>Hepatozoon</i> sp. Curupira 2 (AY461377)	97	<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	América do Sul	Criado-Fornelio et al. (2006)
F	<i>H. felis</i> LaCONES (HQ829439)	97	<i>Panthera leo persica</i>	Índia	Asia	Pawar et al. (2012)
	<i>H. felis</i> W129 1 (AB636285)	97	<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i>	Japão	Asia	
	<i>H. felis</i> W129 2 (AB636286)	97	<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i>	Japão	Asia	Sakuma e al. (2011)
	<i>H. felis</i> W129 3 (AB636287)	97	<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i>	Japão	Asia	
	<i>Hepatozoon</i> sp. (EU028344)	99	<i>Leopardus pardalis</i>	Brasil	América do Sul	Metzger et al. (2008)
	<i>Hepatozoon</i> sp. (EU267606)	98	<i>Leopardus pardalis</i>	Brasil	América do Sul	
	<i>H. felis</i> CMS-29 (AB771576)	97	<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>	Japão	Asia	Tateno et al. (2013)
	<i>H. felis</i> Cuiabá (KM435071)	-	<i>Felis catus domesticus</i>	Brasil	América do Sul	Este artigo

\* Dados não publicados. Registros do Genbank

# APÊNDICE D

Figura 1. Árvore filogenética baseada em variações de seqüências de nucleotídeos de DNA do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp. detectadas em gatos domésticos, de acordo com os métodos Máxima Parsimônia (A) e Bayesianos (B). Números dos nós representam valores suportes para os principais ramos (bootstrap/probabilidade posterior; 1000 replicações). *Babesia* sp. (AF188001) foi incluída como grupo externo na árvore filogenética.





# APÊNDICE E

**Felinos domésticos parasitados por carrapato *Rhipicephalus sanguineus* infectados por *Ehrlichia canis* no Brasil.**

Ísis Assis Braga<sup>1,2</sup>, Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques<sup>1</sup>, Jackeliny dos Santos Costa<sup>1</sup>, Ingrid Savino de Oliveira Dias<sup>5</sup>, Estefânia Crivelatti Grontoski<sup>5</sup>, Thaysa Felfili Ziliani<sup>3</sup>, Andréia Lima Tomé Melo<sup>4</sup>, Daniel Moura de Aguiar<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Mineiros, 75830-000. Mineiros, GO, Brasil.

<sup>3</sup> Clínica Médica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT. 78060-900, Brasil.

<sup>4</sup> Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>5</sup> Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

\* Endereço do autor correspondente: Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa, 2367, Boa Esperança, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil. Telefone: +55 65 3615-8662, Endereço de E-mail: danmoura@ufmt.br (D.M. Aguiar)

## **BREVE COMUNICAÇÃO**

### **Resumo**

Os ectoparasitas são capazes de transmitir patógenos específicos, incluindo algumas bactérias, causando doenças infecciosas em animais domésticos. Descrições de parasitismo por carrapatos em gatos domésticos são escassos, porém neste estudo, relata-se o parasitismo de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil. Os felinos foram submetidos à exames clínicos e hematológicos e análise molecular para detecção de *Ehrlichia* spp. Do mesmo modo, os carrapatos removidos dos gatos foram identificados e analisados para detecção de *Ehrlichia* spp. Ambos, gatos e carrapatos foram analisados por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do gene *dsb*, e as sequências das amostras positivas demonstraram ser 100% idênticas à *E. canis*. No presente estudo, além da descrição de parasitismo, destacamos pela primeira vez, a presença de DNA erliquial idêntico a *E. canis* tanto nos felinos quanto no carrapato que o parasitava, o que ressalta a importância dos gatos como reservatório de *E. canis* e sua posição no ciclo de transmissão entre cães e gatos no Brasil.

Palavras-chave: Erliquiose felina, carrapatos, *Ehrlichia* spp.

### **Abstract**

Ectoparasites are capable of transmitting specific pathogens including some bacteria causing infectious diseases in domestic animals. Since descriptions of tick infestations in domestic cats are scarce, this paper report parasitism of *Rhipicephalus sanguineus* ticks in cats attended at a Veterinary Hospital in Brazil. Cats were submitted out for clinical and hematological examination and molecular analysis for detection of *Ehrlichia* spp. In addition, *R. sanguineus* ticks removed from the cats were analyzed for detection of *Ehrlichia* spp. Both cats and ticks were tested by Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect the *dsb* gene and sequence analysis of positives showed samples 100% identical to *E. canis*. In the present study we report for the first time the infestation by *R. sanguineus* in domestic cats and the presence of erlichial

DNA identical to *E. canis* in the animals and ticks. Based on this report, we discuss the importance of cats as reservoir of *E. canis* and its position in transmission cycle between dogs and cats in Brazil.

Keywords: Feline ehrlichiosis, Ticks, *Ehrlichia* spp.

Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* são importantes ectoparasitas de canídeos domésticos, sendo altamente prevalente entre os cães de todas as regiões do Brasil (Labruna e Pereira, 2001). Além do mais, são vetores competentes da *Ehrlichia canis*, bactéria Gram negativa e intracelular, responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC) (Moraes-Fillho et al., 2015). Descrições de parasitismo por *R. sanguineus* em felinos domésticos têm sido observadas em algumas regiões do Brasil (Ferreira et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Mendes-Almeida et al., 2011), apesar de ser incomum, visto que o felino não se comporta como hospedeiro primário deste ectoparasita, e seus hábitos higiênicos dificultam a manutenção da população de *R. sanguineus* no ambiente (Labruna e Pereira, 2001; Breitschwerdt et al., 2002).

Embora a transmissão de *E. canis*, em cães, pelo carrapato *R. sanguineus* seja efetiva, o ciclo de transmissão natural desta bactéria em gatos não está totalmente estabelecido (Amyx e Huxsoll, 1973; Groves et al., 1975). No entanto, a presença de DNA de *E. canis* tem sido relatada em gatos domiciliados e não domiciliados em diversas partes do mundo (Breitschwerdt et al., 2002; Oliveira, et al., 2009; Braga et al., 2010; Braga et al., 2013). A relevância dos felinos domésticos como reservatórios da *E. canis* e sua posição no ciclo de transmissão entre cães e gatos necessita ser amplamente estudado, contudo, este trabalho relata o parasitismo por *R. sanguineus* em gatos e a primeira detecção simultânea de *E. canis* em ambos, hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Entre julho de 2013 e fevereiro de 2014, oito felinos parasitados por carrapatos foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT). Amostras sanguíneas foram coletadas, por venopunção da jugular externa, a fim de se realizar análise hematológica e molecular para detecção de *Ehrlichia* spp. Os ectoparasitas foram retirados, analisados usando um microscópio estereoscópio e identificado de acordo com a chave taxonômica de Barros- Battesti et

al. (2006), e em seguida armazenado em microtubos de polipropileno contendo álcool isopropílico.

As coletas das amostras foram conduzidas de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa em Animais estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência com Animais de Laboratório (SBCAL) e sob o controle institucional do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT (número de protocolo – UFMT: 23108. 019110/12-2).

A análise hematológica foi realizada seguindo os protocolos do Laboratório de Patologia Clínica do HOVET-UFMT, que adota os parâmetros de referência de Jain (1993). Para a análise molecular, as amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA através do kit comercial Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences, Hangzhou, China) conforme as instruções do fabricante e a extração de DNA dos carrapatos foram realizadas com Tiocianato de Guanidina, de acordo com o protocolo de Sangioni et al. (2005). Em seguida, DNA genômico de ambos foram submetidos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase, que visou à amplificação de um fragmento de 409-pb do gene *dsb* de *Ehrlichia*, utilizando-se uma PCR contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 0,4 µM de cada iniciador (primer) *dsb*: *dsb*-330 (5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e *dsb*-728 (5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'); 1,25 U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA polymerase – Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCl; 20 mM Tris-HCl e 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Doyle et al., 2005).

Os produtos amplificados foram purificados com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Bio-Sciences) segundo instruções do fabricante, em seguida, submetidos ao sequenciamento genético utilizando Big Dye (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, em sequenciador automático de DNA modelo ABI PRISM-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer). As sequências obtidas foram editadas no software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsband, CA) e posteriormente analisada através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a fim de verificar a identidade com demais sequências correspondentes disponíveis no *GenBank*.

De oito felinos avaliados, quatro eram adultos (≥ 12 meses), sendo três machos e uma fêmea, e quatro jovens (<12 meses), dois machos e duas fêmeas. Seis não possuíam raças definidas e dois eram da raça Persas. Apenas um gato era de rua,

sendo resgatado e levado para atendimento médico e os demais eram domiciliados, no entanto, todos tinham contato com cães. Na avaliação clínico-laboratorial foram observados apatia, dispneia, paralisia dos membros, desidratação e trombocitopenia. Além do mais, a análise molecular revelou a presença três felinos positivos para *Ehrlichia* spp. (Tabela 1). Os ectoparasitos, removidos principalmente da cabeça e pescoço, foram identificados nas fases de larvas, ninfas e adultos (Figura 1). Uma única fêmea de *R. sanguineus* apresentou DNA de *Ehrlichia* spp, e este carrapato foi removido de um felino que apresentou positividade para infecção por *Ehrlichia*, no entanto ele não apresentava sinais clínicos (Tabela 1). As sequências parciais geradas pelas amostras positivas na PCR foram analisadas e mostraram-se idênticas entre si e entre outras sequências de *E. canis* disponíveis no GenBank (GU586135.1, DQ460716.1).

É crescente o número de relatos de exposição e possíveis infecções por *Ehrlichia* spp. em gatos domésticos (Breitschwerdt et al., 2002; Oliveira, et al., 2009; Braga et al., 2010; Braga et al., 2013), o que demonstra a necessidade de inclusão da erliquiose felina como diagnóstico diferencial de gatos com alterações hematológicas e parasitados por carrapatos. Três gatos infestados por *R. sanguineus* apresentaram positividade na PCR para *E. canis*, porém, apenas um deles apresentava sintoma de apatia, segundo o proprietário. A patogênese da infecção por *E. canis* em gatos não está muito bem elucidada, entretanto, já foram observados anemia, trombocitopenia, linfopenia e monocitose em felinos portadores de DNA erliquial (Braga et al., 2013).

A descrição de parasitismo por *R. sanguineus* em felinos domésticos na região central do Brasil, colabora com os raros relatos de parasitismo em gatos (Ferreira et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Mendes-Almeida et al., 2011). Os carrapatos foram localizados em regiões anatômicas dos animais de difícil acesso, o que dificulta a remoção dos mesmos pelos animais.

O clima tropical da região metropolitana de Cuiabá demonstra condições favoráveis para a manutenção do vetor *R. sanguineus* (Rodriguez -Vivas, 2005). Além do mais, os resultados deste estudo, colaboram com os apresentados por Parola et al. (2008), que relataram mudanças de comportamento em carrapatos que se alimentavam expostos à altas temperaturas. Considerando a temperatura média anual da região metropolitana de Cuiabá, que varia de 30 a 32°C (IBGE, 2010), a infestação de *R. sanguineus* em outros hospedeiros, que não seja o cão, pode ser explicada.

Adicionalmente ao parasitismo, foi detectado a presença de DNA de *E. canis* e um carrapato removido de um gato positivo para *E. canis*. Ambas sequências geradas foram idênticas entre si e entre outras sequências de *E. canis*, indicando que se trata do mesmo agente infeccioso. A transmissão de *E. canis* para carrapatos *R. sanguineus* ocorrem de forma transestadial e intraestadial (Bremer et al., 2005). Não se pode presumir com estes resultados, que a presença de *E. canis* no carrapato foi resultado do repasto sanguíneo no animal infectado, ou que a infecção felina foi decorrente da transmissão pelo carrapato infectado. No entanto, portamos informações substanciais de que felinos domésticos e *R. sanguineus* estão envolvidos no processo de transmissão e manutenção da *E. canis* no ambiente.

Contudo, este trabalho, enfatiza a possibilidade de o carrapato *R. sanguineus* atuar no ciclo de transmissão de *E. canis* nos felinos domésticos, sendo o primeiro relato de infecção mútua de *E. canis* no vetor *R. sanguineus* e um mamífero não considerado hospedeiro primário, o gato. Demais estudos são necessários visando avaliar a posição do felino doméstico na epidemiologia da *E. canis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, p.403-410, 1990.

AMYX, H.L., HUXSOLL, D.L. Red and gray foxes--potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **Journal of Wildlife Diseases**. v.9, 47-50. 1997.

BARROS- BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. (Eds.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 2006.

BRAGA, M.S.C.O., ANDRE, M.R., FRESCHI, C.R., TEIXEIRA, M.C.A., MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luis Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.21, p.37-41, 2012.

BRAGA, I.A., SANTOS, L.G.F., MELO, A.L.T., JAUNE, F.W., ZILIANI, T.F., GIRARDI, A.F., AGUIAR, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, p.470-474, 2013.

BREITSCHWERDT, E.B., BRAMS-OGG, A.C.G., LAPPIN, M.R., BIENZLE, D., HANCOCK, S.I., COWAN, S.M., CLOOTEN, J.K., HEGARTY, B.C., HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.16, p. 642-649, 2002.

BREMER, W.G., SCHAEFER, J.J., WAGNER, E.R., EWING, S.A., RIKIHISA, Y., NEEDHAM, G.R., JITTAPALAPONG, S., MOORE, D.L., STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**. v.31, p. 95–105, 2005.

DOYLE, C.K., LABRUNA, M.B., BREITSCHWERD, E.B., TANG, Y.W., CORSTVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K.C., LI, P., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor taqman real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**. v.7, p.504-510, 2005.

FERREIRA, C.G.T., BEZERRA, A.C.D.S., FILGUEIRA, K.D.F., FONSECA, Z.A.A.S., AHID, S.M.M. Levantamento de ectoparasitas de cães e gatos provenientes do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. **PUBVET**. v.3. p. 549-556, 2009.



FERREIRA, D.R.A., ALVES, L.C., FAUSTINO, M.A.G. Ectoparasitos de *Felis catus domesticus* (Linnaeus, 1758) na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Biotemas**. v.23, p.43-50, 2010.

GROVES, M.G., DENNIS, G.L., AMYX, H.L., HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**. v.36, p.937-94, 1975.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), IBGE Cidades @. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm1>, 2010.

JAIN, C. Essentials of Veterinary Hematology, Lea & Febiger, **Philadelphia**, 1993.

LABRUNA, M.B., PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Revista Clínica Veterinária**. v.30, p.24–32, 2001.

MENDES-ALMEIDA, F., CRISSIUMA, A.L., GERSHONY, L.C., WILLI, L.M.V., PAIVA, J.P., GUERRERO, J., LABARTHE, N. Characterization of ectoparasites in an urban cat (*Felis catus* Linnaeu, 1758) population of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Parasitologia**. v.108, p.1431-1435, 2011.

MORAES-FILHO, J., KRAWCZAK, F.S., COSTA, F.B., SOARES, J.F., LABRUNA, M.B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **PLoS ONE**. v.10(9), 2015.

OLIVEIRA, L.S., MOURÃO, L.C., OLIVEIRA, K.A., AGOSTINI, M.M., OLIVEIRA, A.C., ALMEIDA, M.R., FIETTO, J.L.R., CONCEIÇÃO, L.G., FILHO, J.D.R., GALVÃO, M.A.M., MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**. v.5, p. 53-54, 2009.

PAROLA, P., SOCOLOVSCHI, C., JEANJEAN, L., BITAM, I., FOURNIER, P.E., SOTTO, A., LABAUGE, P., RAOULT, D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.2, p.338, 2008.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., ALBORNOZ, R.E.F., BOLIO, G.M.E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: Seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**. v.127, p.75-79, 2005.

SANGIONI, L.A., HORTA, M.C., VIANNA, M.C.B., GENNARI, S.M., SOARES, R.M., GALVÃO, M.A., SCHUMAKER, T.T., FERREIRA, F., VIDOTTO, O., LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Disease**. v.1, p.265–270, 2005.

# APÊNDICE F

**Tabela 1-** Relação dos felinos avaliados quanto a sinais clínicos, parasitismo por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e detecção de DNA de *Ehrlichia* spp. através de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Felino	Sexo	Idade	Raça	Exame Clínico	DNA erliquial em amostra de sangue	Estágio do <i>R. sanguineus</i>	DNA erliquial em amostra de carrapatos
1	M	5 meses	SRD	Sem alteração	Presente	M F N	Ausente Presente Ausente
2	F	6 anos	Persa	Sem alteração	Presente	M	Ausente
3	M	2 anos	SRD	Apatia	Ausente	M	Ausente
4	F	6 meses	Persa	Sem alteração	Ausente	L <sub>1</sub>	Ausente
						L <sub>2</sub>	Ausente
						L <sub>3</sub>	Ausente
						L <sub>4</sub>	Ausente
						L <sub>5</sub>	Ausente
						L <sub>6</sub>	Ausente
						L <sub>7</sub>	Ausente
						L <sub>8</sub>	Ausente
5	F	2 meses	SRD	Apatia	Presente	L <sub>1</sub>	Ausente
						L <sub>2</sub>	Ausente
						L <sub>3</sub>	Ausente
						N <sub>1</sub>	Ausente
						N <sub>2</sub>	Ausente
						N <sub>3</sub>	Ausente
6	M	3 meses	SRD	Dispneia Paralisia dos membros	Ausente	M	Ausente
7	M	2 anos	SRD	Trombocitopenia Desidratação	Ausente	N <sub>1</sub>	Ausente
						N <sub>2</sub>	Ausente
						N <sub>3</sub>	Ausente
						F	Ausente
						M	Ausente
8	M	4 anos	SRD	Trombocitopenia	Ausente	F	Ausente

F: fêmea; M: macho; N: ninfa; L: larva, SRD: sem raça definida

# APÊNDICE G



**Figura 1-** Carrapato *Rhipicephalus sanguineus* parasitando o pavilhão auditivo de um felino doméstico.

# APÊNDICE H

## **Identificação de diferentes genótipos de *Ehrlichia canis* em felinos domésticos do Brasil**

Ísis Assis Braga<sup>1,2</sup>, Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques<sup>1</sup>, Ingrid Savino de Oliveira Dias<sup>5</sup>, Estefânia Crivelatti Grontoski<sup>5</sup>, Filipe Dantas-Torres<sup>3</sup>, Daniel Moura de Aguiar<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Mineiros, 75830-000. Mineiros, GO, Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Imunologia. Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

\* Endereço do autor correspondente: Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa, 2367, Boa Esperança, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil. Telefone: +55 65 3615-8662, Endereço de E-mail: danmoura@ufmt.br (D.M. Aguiar)



## Introdução

*Ehrlichia canis* é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), uma doença crônica e muitas vezes letal, que está relacionada à distribuição do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Zweygarth et al., 2014; Moraes-Fillho et al., 2015). Alguns pesquisadores observaram infecções por *E. canis* em alguns vertebrados, além dos cães domésticos, como: canídeos selvagens, felinos domésticos e até mesmo humanos (Stich et al., 2008; Bouza-Mora et al., 2017). São crescentes os relatos de exposição por *Ehrlichia* spp. em gatos domésticos ao redor do mundo (Bouloy et al., 1994; Beaufils et al., 1995; Aguirre et al., 2004; Fontalvo et al., 2016), bem como descrições de DNA intimamente relacionados à *E. canis* em sangue total de gatos (Breitschwerdt et al., 2002; Oliveira et al., 2009; Braga et al., 2012; Braga et al., 2014).

A erliquiose felina tem sido investigada a fim de obter maiores informações sobre a dinâmica da infecção (Buoro et al., 1989; Bouloy et al., 1994; Beaufils et al., 1995; Braga et al., 2013a), porém dados relativos a persistência da infecção em gatos ou ao desenvolvimento de implicações imunopatológicas ainda são escassos nessa espécie (Shaw et al., 2001). Sabe-se que processo infecciosos indutores de imunossupressão como a infecção pelo vírus da Imunodeficiência felina pode favorecer infecção por *E. canis* em gatos e inclusive resultar para um prognóstico desfavorável ao animal (Braga et al., 2013b). Além do mais, embora, algumas sequências de *E. canis* baseadas no gene 16S rRNA tenham demonstrado alta similaridade entre isolados de diversas regiões do mundo, alguns estudos têm demonstrado elevado grau de diversidade da *E. canis*, baseando-se na diferença do gene TRP (*tandem repeat proteins*) (Doyle et al., 2005, Zhang et al., 2008, Hsieh et al., 2010, Aguiar et al., 2013, Bouza-Mora et al., 2017). Tal diversidade de genótipos podem expressar novos fenótipos, resultando em diferentes formas de apresentação da doença (Ferreira et al., 2014).

As proteínas TRP19 e TRP36 de *E. canis* são importantes proteínas imunorreativas e alvos primários da resposta de anticorpos do hospedeiro durante a infecção. A proteína TRP19, expressada nas membranas de mórulas e na superfície dos corpos reticulados de *E. canis*, é considerada um importante instrumento para distinguir anticorpos específicos para o agente (McBride et al., 2007). Enquanto que

a proteína TRP36 de *E. canis*, exposta na superfície bacteriana e secretada no citoplasma do hospedeiro, contém uma sequência de aminoácidos que varia entre algumas cepas, por isso é considerada útil para avaliar a diversidade entre os diferentes isolados. No Brasil, dois genótipos distintos já foram descritos em cães infectados, um chamado de genótipo americano (USTRP36), cuja a sequência de aminoácidos da região de repetição (TR) é 'TEDSVSAPA', e o outro detectado somente no Brasil (genótipo brasileiro; BrTRP36), que possui uma sequência de aminoácidos totalmente divergente 'ASVVPEAE' (Aguiar et al., 2013).

A sensibilidade e especificidade destas proteínas para o imunodiagnóstico espécie-específico tem sido determinada usando proteínas recombinantes e ensaios baseados em peptídeos sintéticos, contudo, o objetivo deste estudo é identificar anticorpos anti-*E. canis* por meio da proteína TRP19, e distinguir os genótipos envolvidos na infecção, baseados nas proteínas TRP36, avaliados por meio de Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA), em banco de soro felino da região metropolitana de Cuiabá, testados em estudo anterior (Braga et al., 2014).

## Material e Métodos

### Amostras

Amostras de soro de 105 felinos domésticos (76 soropositivas e 29 soronegativas), coletadas e analisadas por meio de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Braga et al., 2014) foram submetidas ao ELISA e ao teste imucromatográfico SNAP\* 4Dx\* Plus.

### ELISA

Anticorpos anti-*E. canis* foram avaliados frente ao peptídeo correspondente à região do epítopo da proteína TRP19 (24-mer, HFTGPTFSEVNLSEEEKMELQEV) (McBride et al., 2007). Para definição do genótipo responsável pela positividade, foram utilizados peptídeos imunorreativos correspondentes aos epítopos das regiões de repetição (TR) da proteína TRP36 do genótipo americano (USTRP36) (18-mer; TEDSVSAPATEDSVSAPA) (Doyle et al., 2006) e brasileiro (24-mer, ASVVPEAEASVVPEAEASVVPEAE) (Aguiar et al., 2013). O peptídeo correspondente a região C-terminal da proteína TRP36 do isolado Israel de *E. canis*

(IS36-C-V, 15-mer, NPTGLKFLDLYTQLTL) foi utilizado como peptídeo controle, devido sua baixa imunorreatividade (Zhang et al., 2008). Os peptídeos foram sintetizados comercialmente (AminoTech, Diadema, SP) e ressuspensos em água ultra pura na concentração de 1mg/mL até o momento das análises.

Os ensaios foram realizados conforme preconizado por Aguiar et al. (2016). Foram utilizadas placas de ELISA MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Denmark). Os peptídeos foram diluídos em solução salina fosfatada (PBS; pH7,4) na concentração de 1,0 µg/ 50 µl e foram adsorvidos nas placas em temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Posteriormente a placa foi lavada três vezes com 200µL de solução TRIS salina tamponada com 0,2% de Tween 20 (TBST) e em seguida realizado o bloqueio da placa com 100 µL de TBST com 10% de soro equino (Sigma H1270) por 1 hora em temperatura ambiente com agitação e novamente lavada como descrito acima.

Os soros dos felinos foram diluídos a 1:200 em TBST com 5% de soro equino (Sigma H1270) sendo adicionado 50 µL da solução por cavidade, e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com TBST. Em seguida foi adicionada em cada cavidade 50 µL de conjugado caprino anti-IgG de felino marcado com fosfatase alcalina (H+L; Sigma-Aldrich Laboratories, USA) na diluição de 1:5000 em TBST com 5% de soro equino. A placa foi incubada novamente por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Após este período a placa foi lavada por quatro vezes em TBST e depois incubada por 30 minutos com 100 µl de substrato BluePhos (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). O desenvolvimento colorimétrico foi determinado em leitor óptico de microplacas (absorbância de 650nm) Epoch <sup>TM</sup> (Biotek Instruments, Winoosli, VT, EUA) e os dados analisados em software GEN5 Gen5<sup>TM</sup> Data Analysis (Biotek Instruments, Winoosli, VT, EUA).

O valor da Densidade Óptica (DO) de cada soro testado foi representado pela média de três leituras ( $\pm$  desvio padrão) (cada peptídeo adsorvido em triplicata) subtraído do valor de DO resultante do peptídeo controle (IS36-C-V). A amostra que apresentou 0,300 unidades acima do valor da DO do peptídeo controle foi considerada positiva (Aguiar et al., 2016).

Um grupo de amostras com resultados discordantes entre a RIFI e ambos os testes de ELISA foram avaliados pelo teste imunocromatográfico SNAP\* 4Dx\* Plus (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME), segundo as orientações do fabricante. Este ensaio foi desenvolvido para detecção de anticorpos Anti-*Anaplasma* spp. e *E. canis* em cães.

## Resultados

Das amostras positivas na RIFI, 14 (13,3%) reagiram ao peptídeo TRP19, 09 (8,5%) ao peptídeo BrTRP36 e 04 (3,8%) ao peptídeo USTRP36. Reações frente aos dois peptídeos TRP36 foram observadas em 02 (1,9%) amostras. Das amostras negativas na RIFI, nenhuma reagiu ao peptídeo TRP19, 01 (0,9%) reagiu frente ao peptídeo BrTRP36 e 01 (0,9%) ao peptídeo USTRP36. (Tabela 1).

Foram observadas que duas amostras soropositivas na RIFI reagiram ao teste imunocromatográfico SNAP\* 4Dx\* Plus. Uma foi positiva para *E. canis* e *Anaplasma* spp., que reagiram frente ao peptídeo TRP19 e outra positiva somente para *E. canis* que reagiram aos peptídeos TRP19 e USTRP36. Uma amostra não reativa nas análises da RIFI e ELISA, mostrou-se positiva para *Anaplasma* spp. (Tabela 1).

## Discussão

Um estudo realizado anteriormente, demonstrou através da técnica Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que felinos domésticos da região centro-oeste do Brasil haviam sido expostos à *Ehrlichia* spp. (Braga et al., 2014). No presente estudo, foi observado que uma parcela desses animais (13,3%) reagiram frente ao peptídeo TRP19, demonstrando que foram sensibilizados previamente pela *E. canis*. Considerando a especificidade relatada do peptídeo TRP19 no sorodiagnóstico da *E. canis* (McBride et al., 2007), o presente estudo relata pela primeira vez anticorpos específicos anti-*E. canis* na espécie felina. Como a erliquiose felina permanece uma incógnita entre pesquisadores e médicos veterinários, os resultados do presente estudo a demonstram que esta espécie de *Ehrlichia* possa estar envolvida na etiologia da infecção em gatos no Brasil.

A proteína TRP36 de *E. canis* é considerada útil para avaliar a diversidade entre os diferentes isolados, pois contém uma sequência de aminoácidos que varia entre algumas cepas. Ambos peptídeos da proteína TRP36 (USTRP36 e BrTRP36) apresentaram reações perante às amostras dos felinos, demonstrando o envolvimento de ambos os genótipos na infecção em felinos do Brasil. Tal resultado corrobora os dados apresentados por Aguiar et al. (2013), que observaram a presença dos dois genótipos em amostras de cães do Brasil. Enquanto o genótipo americano (USTRP36) foram detectados em cepas da África do Sul, Camarões, Brasil, Espanha, Estados Unidos, Israel, Nigéria e Taiwan (Doyle et al., 2005; Zhang et al., 2008; Hsieh et al., 2010; Aguiar et al., 2013; Kamani et al., 2013; Zwegarth et al., 2014), o genótipo brasileiro (BrTRP36) foi detectado apenas em isolados do Brasil (Aguiar et al., 2013).

Coinfecção entre os genótipos também foram observados em dois animais, demonstrando que o felino pode albergar os diferentes genótipos e até participar de possíveis recombinações entre os mesmos, conforme discutido por Aguiar et al. (2013) e Aguiar et al. (2016). Além do mais, um genótipo possuindo uma sequência de repetição desconhecido da proteína TRP36 também pode estar circulando entre esses animais do Brasil, uma vez que 8,5% dos gatos reagiram ao peptídeo TRP19, mas não ao USTRP36 e BrTRP36. Tal fato também foi observado em cães por Aguiar et al. (2016). Recentemente, DNA de um novo genótipo de TRP36 de *E. canis* foi detectado em seres humanos assintomáticos da Costa Rica, demonstrando que a proteína TRP36 possa ser um alvo constante de diversidade, possivelmente em decorrência da pressão seletiva quando submetida a diferentes hospedeiros (Aguiar et al., 2016, Bouza-Mora et al., 2017).

Algumas amostras soropositivas na RIFI não reagiram ao peptídeo TRP19, evidenciando a possibilidade de reação cruzada com outros antígenos relacionados. A RIFI é considerada padrão (*gold standard*) no diagnóstico sorológico da erliquiose canina, sendo realizada a partir de células DH82 infectadas com *E. canis* (Aguiar et al., 2007). Entretanto, determinadas limitações são observadas nesta técnica, como por exemplo, a reatividade cruzada gerada por anticorpos produzidos contra microorganismos antigenicamente próximos, como outras espécies do gênero *Ehrlichia* e até mesmo membros do gênero *Anaplasma*, gerando interpretações equívocas dos resultados (Cárdenas et al., 2007).

Além do mais, amostras não reagentes na RIFI apresentaram reagentes ao TRP19 (Tabela 1), colaborando com Cárdenas et al. (2007) que demonstraram maior sensibilidade no ELISA, visando a proteína TRP19, quando comparados aos antígenos crus de *E. canis* utilizados na RIFI. Um estudo avaliando a cinética de anticorpos contra proteínas recombinantes gp19 (TRP19), gp36 (TRP36) e p28, em soros de cães infectados com *E. canis*, submetidos ao ELISA e Western blot, revelaram que anticorpos contra a gp36 reagiram precocemente em ambos os testes (14 dias pós-infecção), seguido pela reatividade à gp19 (21 dias pós-infecção) e por fim, tardiamente à p28 (28 – 35 dias pós-infecção) (Cárdenas et al., 2007), concordando com os resultados do presente estudo, onde algumas amostras que reagiram ao peptídeo TRP36 (US e Br), porém não reagiram ao TRP19 (Tabela 1).

Foram observados dois animais reagentes frente antígenos de *Anaplasma* spp., através do teste imunocromatográfico SNAP\* 4Dx\* Plus, inclusive uma delas (animal Gt 137 CCZ-VG; Tabela 1), foi reagente na RIFI, porém negativa quando testada no ELISA frente aos peptídeos de *E. canis*. Este resultado é um indicio de que na espécie felina, anticorpos produzidos durante infecção por *Anaplasma* spp. podem gerar reações cruzadas quando utilizados antígenos crus de *E. canis*. Além disso, deve-se ressaltar dados a respeito da sensibilidade do SNAP\* 4Dx\* Plus são desconhecidos para a espécie felina, uma vez que o teste foi padronizado para diagnóstico da erliquiose e anaplasmoses caninas (Stillman et al., 2014).

Diante do exposto, o ELISA baseado na utilização dos peptídeos TRP 19 e TRP36 como antígeno provou-se útil para o sorodiagnóstico da infecção por *E. canis* em gatos, além do que se apresentou mais sensível e específico do que a RIFI, e poderão fornecer informações relevantes na caracterização da epidemiologia da erliquiose na espécie felina.

## **Agradecimentos**

Somos gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 443923/2014-0) pelo apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica de ISSO Dias e EC Grontoski e de produtividade científica de

DMA; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de IA Braga e IIGG Taques.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M., SAITO, T.B., HAGIWARA, M.K., MACHADO, R.Z., LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**. v.37, p.796-802, 2007.

AGUIAR, D.M., ZHANG, X., MELO, A.L., PACHECO, T.A., MENESES, A.M., ZANUTTO, M.S., HORTA, M.C., SANTARÉM, V.A., CAMARGO, L.M., MCBRIDE, J.W., LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v.164, p.315–321, 2013.

AGUIAR, D.M., ZHANG, X., BRAGA, I.A., TAQUES, I.G.G., MCBRIDE, J.W. Detection of genotype-specific *Ehrlichia canis* exposure in Brazillian dogs by TRP36 peptide ELISA. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.7, p. 142-145, 2016.

AGUIRRE, E., TESOURO, M.A., AMUSATEGUI, I., RODRÍGUEZ-FRANCO, F., SAINZ A. Assessment of feline ehrlichiosis in central spain using serology and a polymerase chain reaction technique. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1026, p.103-105, 2004.

BEAUFILS, J.P., MARIN-GRANEL, J., JUMELLE, P. *Ehrlichia* infection in cats: a review of three cases. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**. v.30, p.397–402, 1995.

BOULOY, R.P., LAPPIN, M.R., HOLLAND, C.H., HRALL, M.A., BAKER, D., O'NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.204, p.1475–1478, 1994.

BOUZA-MORA, L., DOLZ, G., SOLÓRZANO-MORALES, A., ROMERO-ZUÑIGA, J.J., SALAZAR-SÁNCHEZ, L., LABRUNA, M. B., AGUIAR, D.M. Novel genotype of

*Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.8, p.36-40, 2017.

BRAGA, M.S.C.O., ANDRE, M.R., FRESCHI, C.R., TEIXEIRA, M.C.A., MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luis Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.21, p.37-41, 2012.

BRAGA, I.A., SANTOS, L.G.F., MELO, A.L.T., JAUNE, F.W., ZILIANI, T.F., GIRARDI, A.F., AGUIAR, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, p.470-474, 2013a.

BRAGA, I.A., TAQUES, I.I.G.G., SANTOS, L.G.F., COSTA, S.R.O.C., DIAS, I.S.O., AGUIAR, D.M. Erliquiose Felina: Relato de co-infecção com vírus da imunodeficiência felina. **Acta Veterinária Brasilica**. v.7, p.249-250, 2013b.

BRAGA, I.A., SANTOS, L.G.F., RAMOS, D.G.S., MELO, A.L.T., MESTRE, G.L.C., AGUIAR, D.M. Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.45, p.641-645, 2014.

BREITSCHWERDT, E.B., ABRAMS-OGG, A.C.G., LAPPIN, M.R., BIENZLE, D., HANCOCK, S.I., COWAN, S.M., CLOOTEN, J.K., HEGARTY, B.C., HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.16, p.642-649, 2002.

BUORO, I.B.J., ATWEL, R.B., KIPTON, J.C., IHIGA, M.A. Feline anemia associated with *Ehrlichia*-like bodies in three domestic shorthaired cats. **Veterinary Research**. v.125, p.434-436, 1989.

CÁRDENAS, A.M., DOYLE, C.K., ZHANG, X., NETHERY, K., CORSTVET, R.E., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity



and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.14, p.123–128, 2007.

DOYLE, C.K., CÁRDENAS, A.M., AGUIAR, D.M., LABRUNA, M.B., NDIP, L.M., YU, X.J., MCBRIDE, J.W. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among isolates from different geographic locations. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1063, p.433-435, 2005.

DOYLE, C.K., NETHERY, K.A., POPOV, V.L., MCBRIDE, J.W. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. **Infection and Immunity**. v.74, p.711–720, 2006.

FERREIRA, R.F., CERQUEIRA, A.M.F., CASTRO, T.X., FERREIRA, E.O., NEVES, F.P.G., BARBOSA, A.V., MACIEIRA, D.B., ALMOSNY, N.R.P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v.23, p.301-308, 2014.

FONTALVO, M.C., BRAGA, I.A., AGUIAR, D.M., HORTA, M.C. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* in cats. **Ciência Animal Brasileira**. v.7, p.418-424. 2016.

HSIEH, Y.C., LEE, C.C., TSANG, C.L., CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**. v.146, p. 70-77, 2010.

KAMANI, J., LEE, C.C., HARUNA, A.M., CHUNG, P.J., WEKA, P.R., CHUNG, Y.T. First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. **Research in Veterinary Science**. v.94, p.27–32, 2013.

MORAES-FILHO, J., KRAWCZAK, F.S., COSTA, F.B., SOARES, J.F., LABRUNA, M.B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **PLoS ONE**. v.10(9), 2015.

OLIVEIRA, L.S., MOURÃO, L.C., OLIVEIRA, K.A., AGOSTINI, M.M., OLIVEIRA, A.C., ALMEIDA, M.R., FIETTO, J.L.R., CONCEIÇÃO, L.G., FILHO, J.D.R., GALVÃO, M.A.M., MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**.v.15, p.53-54, 2009.

SHAW, S.E., DAY, M.J., BIRTLES, R.J., BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**. v.17, p.74-80, 2001.

STICH, R. W., SCHAEFER, J.J., BREMER, W.G., NEEDHAM, G.R., JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 256-273, 2008.

STILLMAN, B.A., MONN, M., LIU, J., THATCHER, B., FOSTER, P., ANDREWS, B., LITTLE, S., EBERTS, M., BREITSCHWERDT, E.B., BEALL, M.J., CHANDRASHEKAR, R. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.245, p. 80-86, 2014.

YU, X.Z., MCBRIDE, J.W., WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Microbiology**. v.143, p.337–346, 2007.

ZHANG, X., LUO, T., KEYSARY, A., BANETH, G., MIYASHIRO, S., STRENGER, C., WANER, T., MCBRIDE, J.W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.15, p.1080–1088, 2008.

ZWEYGARTH, E., CABEZAS-CRUZ, A., JOSEMANS, A.I., OOSTHUIZEN, M.C., MATJILA, P.T., LIS, K., BRONISZEWSKA, M., SCHÖL, H., FERROLHO, J., GRUBHOFFER, L., PASSOS, L.M. In vitro culture and structural differences in the

major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.5, p.423–431, 2014.

# APÊNDICE I

**Tabela 1.** Resultado das amostras de soro felino submetidas á reação de Imunofluorescência indireta com antígenos de *Ehrlichia canis* (RIFI), ao Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA) sensibilizados com peptídeos TRP19, BrTRP36 e USTRP36 e ao SNAP\* 4Dx\* Plus.

Identificação do felino	RIFI		ELISA	
	Título	TRP19	BrTRP36	USTRP36
0803	160	Reagente	-	-
0434*	1280	Reagente	-	-
11055	80	Reagente	-	-
1664	1280	-	Reagente	-
1831	160	Reagente	-	-
1911	-	-	Reagente	-
2156	160	Reagente	-	-
2519**	40960	Reagente	-	Reagente
2958	1280	-	Reagente	-
307	160	-	Reagente	-
347	160	Reagente	Reagente	-
93	1280	Reagente	-	-
952	-	-	-	Reagente
9717	1280	Reagente	-	-
Gt 09 CCZ-Cba	160	Reagente	-	-
Gatil 14	160	Reagente	Reagente	-
Gatil 16	80	Reagente	Reagente	Reagente
Gatil 31	640	Reagente	Reagente	Reagente
Gt 134 CCZ-VG	640	Reagente	-	-
Gt 151 CCZ-VG	160	-	Reagente	-
Gt 137 CCZ-VG***	320	-	-	-

- Amostra não reagente

\* Amostra reagente para *E. canis* e *Anaplasma platys/A. phagocytophilum* (SNAP\* 4Dx\* Plus)

\*\* Amostra reagente para *E. canis* (SNAP\* 4Dx\* Plus)

\*\*\* Amostra reagente para *Anaplasma platys/A. phagocytophilum* (SNAP\* 4Dx\* Plus)