



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**AGENTES RICKETTSALES EM FELINOS DOMÉSTICOS E SELVAGENS NO  
DISTRITO FEDERAL E GOIÁS: ESTUDO DE OCORRÊNCIA.**

**GIOVANA ADORNI MAZZOTTI**

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASILIA/DF  
MARÇO DE 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**AGENTES RICKETTSIALES EM FELINOS DOMÉSTICOS E SELVAGENS NO  
DISTRITO FEDERAL E GOIÁS: ESTUDO DE OCORRÊNCIA.**

**ALUNA: GIOVANA ADORNI MAZZOTTI  
ORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. GIANE REGINA PALUDO**

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASILIA/DF  
MARÇO DE 2020**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AGENTES RICKETTSIALES EM FELINOS DOMÉSTICOS E SELVAGENS NO  
DISTRITO FEDERAL E GOIÁS: ESTUDO DE OCORRÊNCIA.**

**ALUNA: GIOVANA ADORNI MAZZOTTI**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**



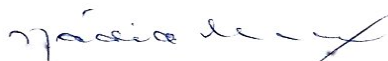
**Giane Regina Paludo, Profª. Dra. (Universidade de Brasília - UnB)  
(ORIENTADORA)**



**Cristiano Barros de Melo, Prof. Dr. (Universidade de Brasília - UnB)**



**Márcio Botelho de Castro, Prof. Dr. (Universidade de Brasília - UnB)**



**Nádia Regina Pereira Almosny, Profª. Dra. (Universidade Federal Fluminense - UFF)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 19 DE MARÇO DE 2020**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MAZZOTTI, G. A. Agentes rickettsiales em felinos domésticos e selvagens no Distrito Federal e Goiás: estudo de ocorrência. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 85 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

MAZZOTTI, Giovana Adorni. Agentes rickettsiales em felinos domésticos e selvagens no Distrito Federal e Goiás: estudo de ocorrência. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2020. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2020.

1. Rickettsiales. 2. Felinos. 3. PCR.

## AGRADECIMENTOS

Aos amores da minha vida! Meu esposo Ulisses e a minha filha Ana, por fazerem tudo valer a pena.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo apoio e inspiração.

Aos felídeos, animais ímpares, que me encantam e fazem com que meu trabalho seja também fonte de prazer e inspiração.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Giane Paludo, por me orientar no seu sentido mais amplo da palavra. Sua generosidade, sapiência e humanidade são contagiantes. Por me ensinar a ser uma melhor profissional, melhor pesquisadora e melhor ser humano.

A minha amiga Marcela Scalon, pelo estímulo, ensinamentos e auxílio em todas as etapas desse e de outros trabalhos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Patologia Clínica da UnB, por toda a ajuda e companheirismo nesses anos de convivência.

À universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais e aos seus professores, pela imensa oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro e de incentivo à pesquisa.

À Fundação Zoológico de Brasília, ao Centro Conservacionista e aos proprietários de gatos, por disponibilizarem os animais e o pessoal para a obtenção das amostras de sangue dos felídeos silvestres e domésticos.

**ÍNDICE**

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 - Agentes rickettsiales em felinos domésticos e selvagens no Distrito Federal e Goiás: estudo de ocorrência.	
1 INTRODUÇÃO	1
3 OBJETIVOS	2
4 REVISÃO DE LITERATURA	3
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2 - Investigação molecular de agentes da ordem Rickettiales em gatos domésticos	
1 RESUMO	37
2 ABSTRACT	37
3 INTRODUÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CAPÍTULO 3 - Investigação molecular de <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Rickettsia</i> spp. em felídeos selvagens cativos	
1 RESUMO	53
2 ABSTRACT	54
3 INTRODUÇÃO	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
5 RESULTADOS	61

6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	69
8 AGRADECIMENTOS	69
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>Página</b>
 <b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1 - Representação esquemática da reorganização de ordem, famílias e gêneros das Rickettsiales, segundo proposto por Dumler <i>et al.</i> (2001).	4
1.2 - Representação esquemática da reorganização da família Anaplasmataceae, segundo proposto por Dumler <i>et al.</i> (2001).	5
1.3 – Ordem das Rickettsiales de importância veterinária presentes no Brasil e seus vetores.	7
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
2.1 - Eletroforese dos produtos da PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos, em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) para a detecção de DNA de agentes Rickettsiales em sangue de gatos domésticos. A. Amplificação do gene GAPDH (GAPDH-F e GAPDH-R, 400pb), sendo (1) Lader, (2) controle positivo, (3-7) animais positivos, (8) controle negativo (água). B. Detecção de DNA da família Anaplasmataceae (EHR16sd e EHR16sr, 345pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos. C. Detecção de DNA da família Rickettsiaceae (CS78 e CS323, 401pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-8) animais negativos. D. Detecção de DNA de <i>Anaplasma platys</i> (EHR16sr e Platys, 678pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos. E. Detecção de DNA de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (MSP3-R e MSP3-F, 179pb), sendo (1) Lader, (2-6) animais negativos, (7) controle positivo, (8) controle negativo (água).	45



### CAPÍTULO 3

3.1 - Figura 3.1. Eletroforese dos produtos da PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos, em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) para a detecção de DNA de agentes Rickettsiales em sangue de felídeos silvestres. A. Amplificação do gene GAPDH (GAPDH-F e GAPDH-R), sendo (1) Lader, (2) controle positivo, (3-7) animais positivos, (8) controle negativo (água). B. Detecção de DNA da família Rickettsiaceae (CS78 e CS323), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos. C. Detecção de DNA de *Anaplasma platys* (EHR16sr e Platys), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-10) animais positivos, (11-15) animais negativos. D. Detecção de DNA de *Ehrlichia canis* (HE3 e EHR16sr), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (5 e 7) animais positivos, (4, 6 e 8) animais negativos. E. Detecção de DNA de *Anaplasma phagocytophilum* MSP3-R e MSP3-F, sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (5 e 7) animais positivos, (4, 6 e 8) animais negativos.

62

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1 - Alguns estudos que relatam a ocorrência de agentes rickettsiales em gatos domésticos.	8
1.2 - Alguns estudos que relatam a ocorrência de agentes rickettsiales em felinos selvagens.	11
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2.1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliação da qualidade da extração do DNA (GAPDH*) e para identificação de agentes das famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, e das espécies <i>Anaplasma platys</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em amostras de sangue de felinos domésticos.	43
2.2 - Resultados das análises das amostras de sangue de gatos domiciliados (GD) e gatos de abrigo (GA) para presença de antígeno p27 do FeLV, anticorpos para FIV, PCR para as famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, e PCR para as espécies <i>A. platys</i> e <i>A. phagocytophilum</i> .	44
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3.1 - Descrição dos oligonucleotídeos, sequências, genes e tamanho dos amplicons utilizados para detecção de agentes Rickettsiales.	60
3.2 - Resultados obtidos nas PCR de amostras de sangue de felídeos silvestres provenientes do zoológico (ZOO) e de um centro conservacionista de animais selvagens (CC).	63
3.3 - Média, desvio padrão (dp) e limites inferiores e superiores (intervalo de confiança: IC: 95%) dos parâmetros hematológicos de felídeos silvestres cativos de DF e GO. Os animais foram divididos em grupo de positivos e negativos para agentes Rickettsiales, pela análise de PCR sérica. Não houve diferença significativa entre grupos para os valores das médias e de limites inferiores e superiores dos parâmetros hematológicos, considerando $p \leq 0,05$ , pelo teste T e Mann-Whitney U.	65

## RESUMO

As doenças zoonóticas são reemergentes em todo o mundo, exigindo um grande alinhamento entre a medicina humana e a veterinária para que haja a promoção da Saúde Única (*One health*). Dentre essas doenças, algumas são causadas por agentes rickettsiales, bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias, que são capazes de infectar diversos animais e os humanos. Estudos sobre a ação de algumas espécies dessa ordem em animais de produção e cães são robustos, entretanto, em animais selvagens e gatos domésticos ainda são incipientes. O presente trabalho teve como objetivo identificar a ocorrência de agentes rickettsiales em amostras de sangue de gatos domésticos e felinos silvestres cativos do Distrito Federal e Goiás, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Foram analisadas amostras de sangue de 101 gatos provenientes de residências particulares e de um abrigo para animais. Também foram analisadas amostras de sangue de 34 felídeos selvagens cativos. Em nenhuma amostra de sangue de gatos houve amplificação de DNA de agentes rickettsiales, sendo todas testadas em duplicatas. Dos felídeos selvagens, foi amplificado DNA de *Ehrlichia canis* em 5,8% das amostras, de *A. platys* em 64,7%, e de *A. phagocytophilum* em 5,8% das amostras. O DNA de *Rickettsia* spp. não foi detectado em nenhuma amostra de felídeo silvestre. Os dados sugerem que os felídeos selvagens cativos podem servir como potenciais reservatórios, entretanto, não se detectou a ocorrência em gatos domésticos.

**PALAVRAS CHAVE:** PCR, Rickettsiaceae, Anaplasmataceae, felinos, gatos.

## ABSCTRACT

Vector born diseases are reemerging all over the world, requiring a great alignment between human and veterinary medicine in order to promote One Health. Among these diseases, some are caused by rickettsial agents, obligatory intracellular gram-negative bacteria, which are capable of infecting several animals and humans. Studies on the action of some species of this order in farm animals and dogs are robust, however, in wild animals and domestic cats they are still incipient. This study aimed to identify the occurrence of rickettsial agents in blood samples from domestic cats and wild felines captive in the Distrito Federal and Goiás, using the polymerase chain reaction (PCR). Blood samples from 101 cats from private homes and an animal shelter were analyzed. Blood samples from 34 captive wild felids were also analyzed. In no blood sample of cats there was amplification of DNA from rickettsial agents, all of which were tested in duplicates. From wild felids, DNA from *Ehrlichia canis* was amplified in 5.8% of the samples, *A. platys* in 64.7%, and *A. phagocytophilum* in 5.8% of the samples. The DNA of *Rickettsia* spp. was not detected in any wild felid sample. The data suggest that captive wild felids may serve as potential reservoirs, however, the occurrence in domestic cats has not been detected.

KEY WORDS: PCR, Rickettsiaceae, Anaplasmataceae, felines, cat.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças zoonóticas vêm emergindo e reemergindo em todo o mundo, constituindo em grande desafio para a medicina veterinária e humana (Day, 2011; Parola et al., 2013; Segura et al., 2014a; Maggi and Kramer, 2019). As alterações climáticas e o acesso aos novos nichos ecológicos pelos artrópodes estão intimamente ligados a ampliação geográfica dessas doenças (Maia et al., 2014). Dentre as infecções zoonóticas reemergentes estão as doenças causadas pelos agentes da ordem Rickettsiales, compreendendo as famílias Rickettsiaceae (*Rickettsia* spp.) e Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Neorickettsia* spp. e *Wolbachia* spp.) (Day, 2011).

Os felinos podem ser importantes reservatórios e sentinelas de agentes rickettsiales (Day, 2011; Segura et al., 2014a), devendo-se considerar o estudo dessa inter-relação para a promoção da Saúde Única (*One health*) preconizada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) (Day, 2011; Dantas-Torres and Otranto, 2014b; Maia et al., 2014). Ademais, é possível que felinos domésticos e selvagens sejam vítimas de doenças causadas por esses agentes, muitas vezes negligenciadas em decorrência dos estudos escassos sobre a ocorrência e da patogenicidade dos agentes rickettsiales nessas espécies (Andre et al., 2012; Allison and Little, 2013).

No Distrito Federal e Goiás não há estudos sobre a ocorrência de agentes rickettsiales infectando felinos domésticos e/ou selvagens, tampouco quais as possíveis alterações hematológicas associadas. Uma vez que felinos domésticos e selvagens pertencem à mesma família (*Felidae*), acredita-se que haja uma relação filogenética entre os agentes rickettsiales que os parasitam. Estabelecer a ocorrência de agentes rickettsiales em gatos domésticos também permite maiores estudos sobre a importância da espécie na transmissão de zoonoses.

## 1.2. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de agentes da ordem Rickettsiales em felinos domésticos e silvestres cativos do Distrito Federal e Goiás.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar a detecção de agentes da ordem das Rickettsiales por meio da reação em cadeia pela polimerase em amostras de sangue de gatos domiciliados e provenientes de um abrigo, do Distrito Federal;
- Realizar a detecção de agentes da ordem das Rickettsiales por meio da reação em cadeia pela polimerase em amostras de sangue de felídeos silvestres cativos provenientes do Distrito Federal e Goiás;
- Avaliar as possíveis alterações hematológicas decorrentes das infecções por agentes rickettsiales nas amostras de sangue de felídeos selvagens.
- Avaliar se a infecção por retrovírus (vírus da leucemia felina e vírus da imunodeficiência felina) influencia na detecção de agentes rickettsiales nas amostras de sangue de gatos domésticos.
- Avaliar se a presença de pulgas influencia na detecção de agentes rickettsiales nas amostras de sangue de gatos domésticos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A ordem Rickettsiales compreende bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias, muito pequenas (0,3 a 2,0 $\mu$ m), pleomórficas, sem motilidade, capazes de infectar diversos animais e os humanos. Essa ordem é composta pelas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae (Brouqui and Matsumoto, 2007; Fournier and Raoult, 2007). A ordem está albergada na classe das alfa-proteobactérias, assim sendo, estão definidas pela sequência 16S rRNA, e são capazes de sobreviver em meios muito pobres em nutrientes (Ettema and Andersson, 2009).

Em 2001, houve uma reclassificação filogenética dos agentes pertencentes a essa ordem, considerando as características dos genes codificadores da unidade 16S rRNA, dos genes de proteínas de superfície, e dos genes da proteína de choque térmico groESL. Essa reclassificação foi baseada na similaridade desses genes entre as bactérias, reorganizando suas famílias e renomeando algumas delas (Dumler et al., 2001) (Fig. 1.1 e 1.2).

A família Rickettsiaceae ficou restrita as alfa-proteobactérias que infectam livremente citoplasma (onde se multiplicam) ou núcleo das células endoteliais dos hospedeiros (Dumler et al., 2001). Essas bactérias são bacilos intracelulares obrigatórios que medem 0,3-0,5 $\mu$ m por 0,8-2.0 $\mu$ m, gram-negativos. Quando infectam os carrapatos ocorre a transmissão transovariana (transmissão para ovos e larvas) e transtadial (transmissão das larvas para fases subsequentes), favorecendo a infecção por toda a vida e por diversas gerações, sendo os carrapatos considerados seus reservatórios. Quando o agente infecta pulgas e piolhos a transmissão transovariana não ocorre, servindo apenas como vetores e tendo como reservatórios os mamíferos. No ambiente as Rickettsiaceae são inativadas a altas temperaturas (>56°C) e são instáveis, exceto as espécies *R. prowazekii* e *R. typhi* que podem sobreviver por semanas quando nas fezes dos carrapatos (Fournier and Raoult, 2007).

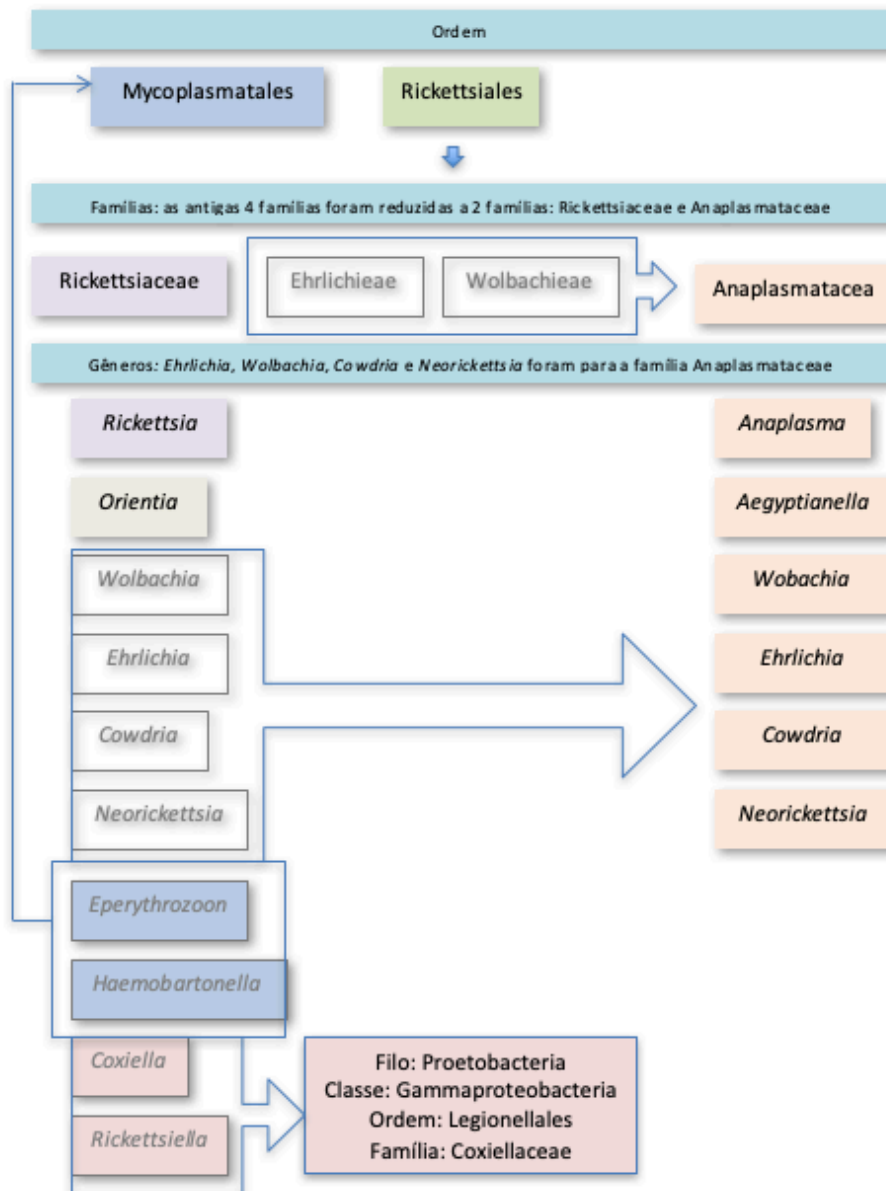


Figura 1.1 - Representação esquemática da reorganização de ordem, famílias e gêneros das Rickettsiales.



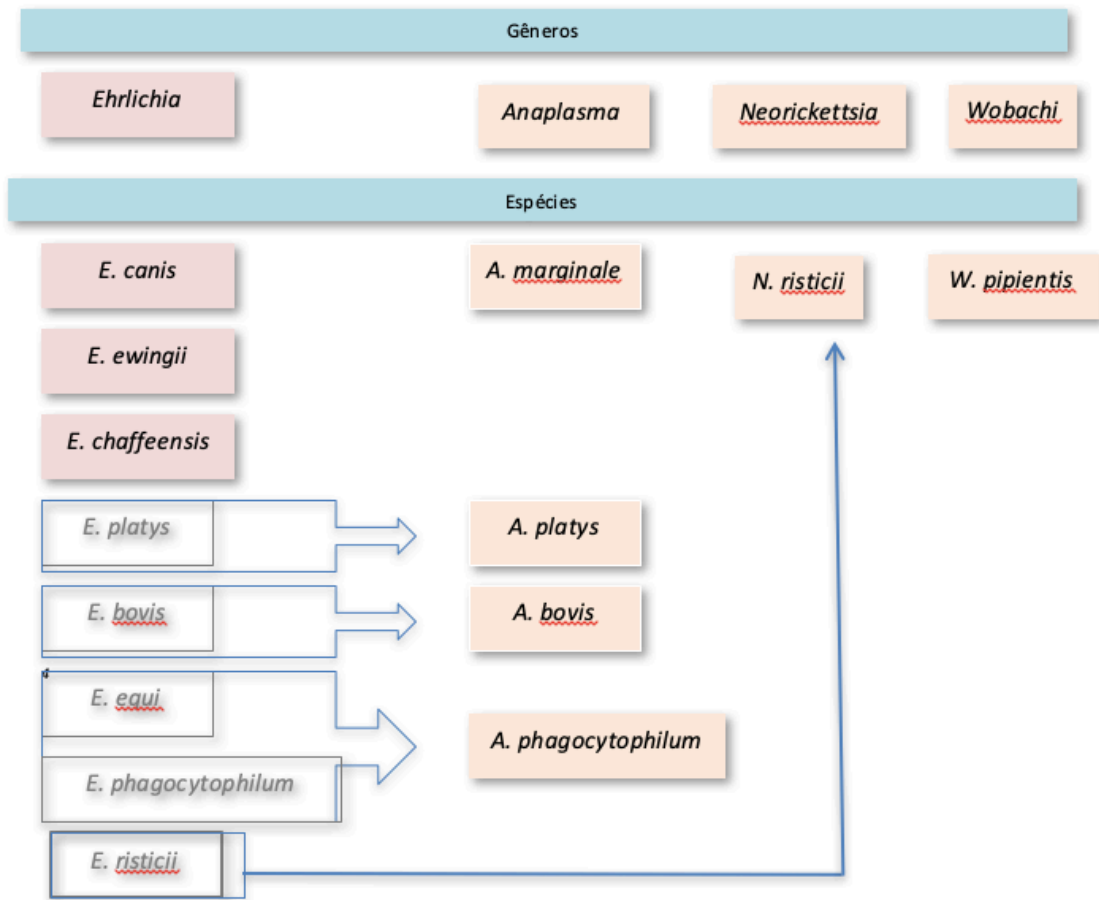


Figura 1.2 - Representação esquemática da reorganização da família Anaplasmataceae.

A família Anaplasmataceae compreende as alfa-proteobactérias que infectam medula óssea, eritrócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e/ou plaquetas de seus hospedeiros. São bactérias intracelulares que variam bastante em tamanho (0,2-1,5µm) e forma (pleomórficas, cocoide/elipsoide), gram-negativas, que fazem vacúolos citoplasmáticos e podem formar mórulas (agregados de vacúolos) nas células sanguíneas. As Neorickettsias são transmitidas e têm como hospedeiros definitivos os trematódeos que parasitam caramujos da família Pleuroceridae. Quando mamíferos ingerem metacercárias dos trematódeos (em peixes ou insetos aquáticos, por exemplo) podem se contaminar e a bactéria infectar monócitos e macrófagos. Os Anaplasmas e as Ehrlichias são transmitidos por carrapatos, que servem apenas como vetores e não reservatórios, uma vez que neles ocorre apenas a transmissão transtadial. Os mamíferos são os reservatórios e as bactérias poderão ser encontradas nas células hematopoiéticas, no sangue periférico, bem como em tecidos do

sistema fagocítico mononuclear (fígado, baço e medula óssea), a depender da espécie infectante (Brouqui and Matsumoto, 2007).

No Brasil, já foram relatadas a ocorrência de nove espécies da família Rickettsiaceae. As espécies cujos vetores são carrapatos pertencem ao Grupo da Febre Maculosa (*Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, '*R. amblyommii*' e "*Candidatus R. andeanae*"), ao Grupo Canadensis (*R. monteiroi*) e ao Grupo bellii (*R. bellii*). As espécies transmitidas por pulgas formam o Grupo de transição (*R. felis*) e o Grupo do tifo (*R. typhi*) (Labruna, 2009; Parola et al., 2013; Soares et al., 2015). Recentemente quatro cepas foram encontradas e estão sendo melhor estudadas para correta classificação e nomeação (Parola et al., 2013). Todos os oito agentes da família Anaplasmataceae relatados no Brasil têm como vetores o carrapato (Anaplasmas e Ehrlichias) ou trematódeo (*Neorickettsia*). Pertencentes ao gênero *Anaplasma*, já foram relatadas a ocorrência das espécies *A. platys* (Lima et al., 2010), *A. phagocytophilum* (Vieira et al., 2011), *A. bovis* (Melo Junior et al., 2010) e *A. marginale* (Picoloto et al., 2010). Do gênero *Ehrlichia* já foram relatadas as espécies *E. canis* (Almosny et al., 1998; Vieira et al., 2011), *E. ewingii* (Oliveira, L. S. et al., 2009) e *E. chaffeensis* (Machado et al., 2006; Harvey et al., 2017). Do gênero *Neorickettsia* já foi relatada a ocorrência da espécie *N. risticii* (Dutra et al., 2001). (Fig. 1.3).

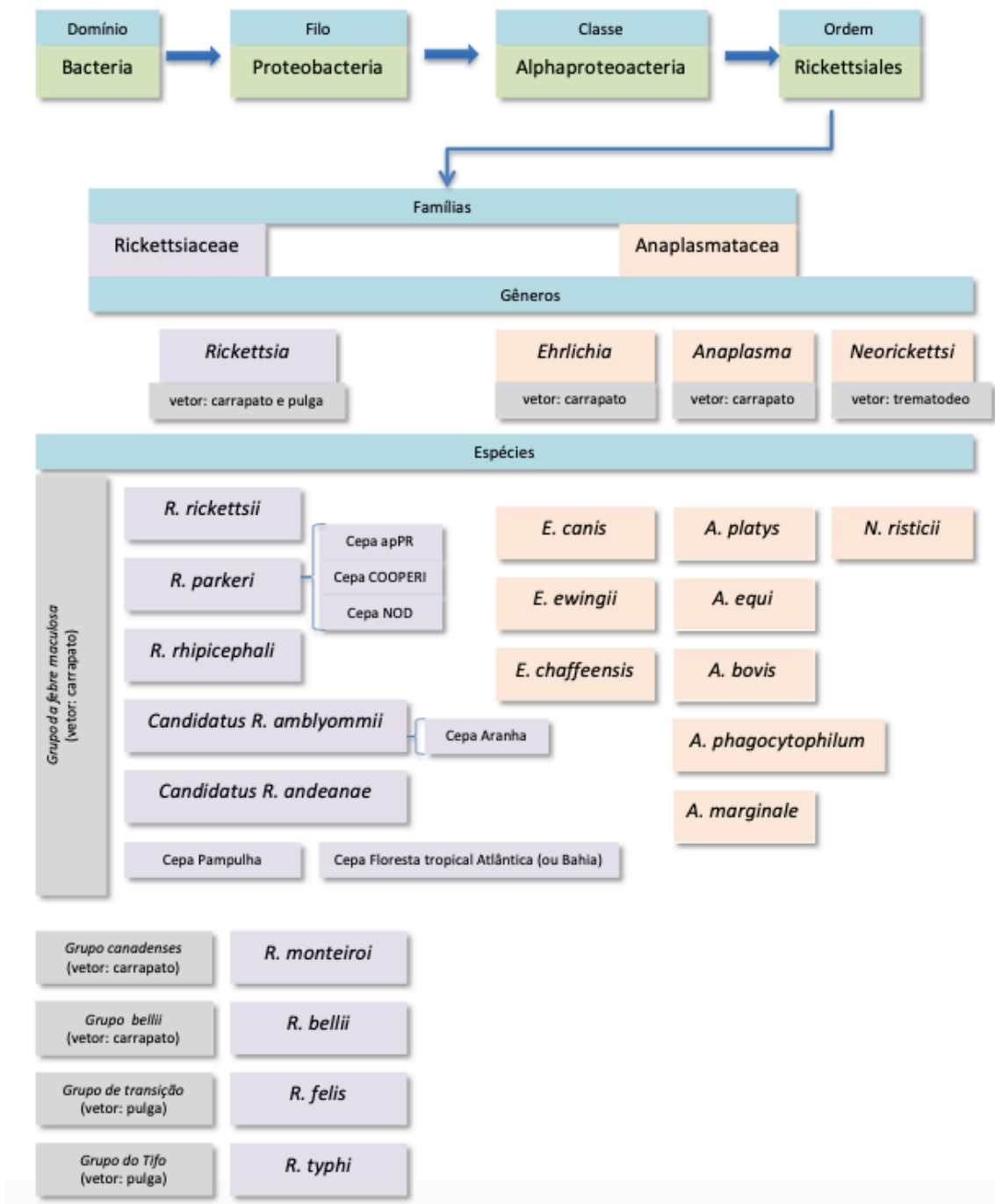


Figura 1.3 – Ordem das Rickettsiales de importância veterinária presentes no Brasil e seus vetores.

Contudo, conforme apresentado nas Tabelas 1.1 e 1.2, há poucos relatos sobre a ocorrência desses agentes em gatos domésticos (Correa, Elisabete S. et al., 2011; Braga et al., 2012; Braga et al., 2014; Maia et al., 2014; Segura et al., 2014a; Pinto et al., 2018) e felinos selvagens (Filoni et al., 2006; Widmer et al., 2011; Mazzotti et al., 2018).

Tabela 1.1 - Alguns estudos que relatam a ocorrência de agentes rickettsiales em gatos domésticos.

Referência	Região	Agente	Técnica	Resultado
Almosny et al. 1998	Brasil	<i>E. canis</i>	M.O.	1 caso
Bayliss et al., 2009	EUA	<i>R. felis</i>	IFA	7/180
			PCR	0/180
		<i>R. rickettsii</i>	IFA	8/182
			PCR	0/182
Braga et al., 2014	Brasil	<i>Ehrlichia</i> spp.	IFA	88/212
			PCR	20/212
			Seq. (20) 100% <i>E. canis</i>	
Braga et al., 2012	Brasil	<i>Ehrlichia</i> spp.	IFA	11/200
			PCR	2/200
			Seq. (1) 98% <i>E. canis</i>	
			(1) 97% <i>E. chaffeensis</i>	
Breitschwerdt et al., 2002	EUA	<i>E. canis</i> -like	IFA	0/3
			ANA	casos
			PCR	3/3
			casos	
			3/3	
casos				
Seq. (3) 100% <i>E. canis</i>				
Correa et al., 2011	Brasil	<i>Ehrlichia</i> sp.	PCR	0/91
		<i>A. platys</i>	M.O.	41/91
			PCR	9/91
Galemore et al., 2018	EUA	<i>A. phagocytophilum</i>	M.O.	0/175
			ELISA•	17/175
			PCR	12/175
Gorna et al., 2013	Polônia	<i>A. phagocytophilum</i>	IFA	1 caso
			PCR	0/1
			Seq. (1) 98,3% <i>A. phagocytophilum</i>	

Guimarães et al., 2019a	Brasil	<i>Anaplasma platys</i>	M.O.	2/216	
			n-PCR	2/216	
			qPCR	8/2016	
			Seq. (2)	100% <i>A. platys</i>	
Guimarães et al., 2019b	Brasil	<i>A. phagocytophilum</i>	n-PCR	0/2016	
			qPCR	0/2016	
			<i>E. canis</i>	IFA	57/216
				n-PCR	3/216
Hegarty et al., 2015	EUA	<i>Anaplasma spp.</i>	qPCR	0/216	
			Seq. (3)	100% <i>E. canis</i>	
Hegarty et al., 2015	EUA	<i>Anaplasma spp.</i>	ELISA**	5/59	
			ELISA*	3/5	
			IFA	3/5	
		<i>Ehrlichia spp.</i>	ELISA**	5/59	
			ELISA*	4/5	
			IFA	3/5	
		<i>A. phagocytophilum</i>	ELISA**	12/59	
			ELISA*	3/12	
			IFA	9/12	
		<i>A. platys</i>	ELISA**	0/59	
			ELISA*	0	
			IFA	0	
		<i>E. canis</i>	ELISA**	5/59	
			ELISA*	0/5	
			IFA	0/5	
		<i>E. chaffeensis</i>	ELISA**	1/59	
			ELISA*	1/1	
			IFA	1/1	
<i>E. ewingii</i>	ELISA**	2/59			
	ELISA*	1/2			
	IFA	1/2			
Heikkilä et al., 2010	Finlândia	<i>A. phagocytophilum</i>	M.O	1 caso	
			qPCR	1 caso	

Lima et al., 2010	Brasil	<i>A. platys</i>	M.O. PCR	1 caso 1 caso
Maia et al., 2014	Portugal	<i>Ehrlichia spp.</i> ou <i>Anaplasma spp.</i>	PCR	35/649
Mendes et al., 2019	Brasil	<i>R. rickettsii</i>	IFA	19/51
Nogueras et al., 2013	Espanha	<i>R. parkeri</i>	IFA	22/51
		<i>R. felis</i>	IFA	3/51
		<i>R. typhi</i>	IFA qPCR Cultura	35/221 5/221 2/221
Oliveira et al. 2018	Angola	<i>E. canis</i>	PCR	3/102
		<i>A. bovis</i>	PCR	1/102
Oliveira et al. 2009	Brasil	<i>E. canis</i>	PCR	3 casos
				Seq. (3) 100% <i>E.canis</i>
Pinto et al., 2018	Brasil	<i>E. canis</i>	M.O.	3/60
			PCR	5/60
		<i>A. platys</i>	M.O.	17/60
			PCR	2/60
		<i>A. phagocytophilum</i>	M.O.	0/60
			IFA PCR	5/60 6/60
Vilhena et al., 2013	Portugal	<i>Ehrlichia spp.</i> ou <i>Anaplasma spp.</i>	PCR	2/320
		<i>Rickettsia</i>	PCR	4/320

M.O. = microscopia óptica; ANA = anticorpos anti-nucleares; IFA = imunofluorescência indireta; PCR = reação em cadeia pela polimerase; qPCR = PCR em tempo real; n-PCR = nested PCR; Seq. = sequenciamento; (n) = nº de sequenciadas

\* SNAP 4DxPlus test IDEXX®

\* \* SNAP M-A test IDEXX®

Tabela 1.2 - Alguns estudos que relatam a ocorrência de agentes rickettsiales em felinos selvagens.

Referência	Região	Espécie	Agente	Técnica	Resultado
Foley et al., 1999	EUA	<i>Puma concolor</i>	<i>E. equi*</i>	IFA	8/47
				n-PCR	8/47
Ryser-Degiorgis et al., 2005	Suíça	<i>Lynx lynx</i>	<i>A. phagocitophilum</i>	IFA	4/106
Filoni et al., 2006	Brasil	<i>Puma concolor</i>	<i>E. canis</i>	IFA	1/18
André et al., 2010	Brasil	<i>Puma yagouarondi</i>	<i>E. canis</i>	IFA	2/6
				n-PCR	1/6
		<i>Leopardus tigrinus</i>		IFA	1/14
				n-PCR	2/14
		<i>Leopardus weidii</i>		IFA	1/2
				n-PCR	0/2
		<i>Felis colocolo</i>		IFA	1/3
				n-PCR	0/3
		<i>Leopardus pardalis</i>		IFA	0/29
				n-PCR	5/29
<i>Puma concolor</i>	IFA	0/9			
	n-PCR	2/9			
<i>Panthera onca</i>	IFA	0/9			
	n-PCR	2/9			
		Todos citados	<i>E. canis</i>	Seq. (11)	98% <i>E. canis</i>
Widmer et al., 2011	Brasil	<i>Panthera onca</i>	<i>E. canis</i>	IFA	4/10
				PCR	2/10
					Seq.(2) 98,7% <i>E. ruminantum</i> 99% <i>Ehrlichia</i> sp.**( <i>Ehrlichia</i> sp. cepa jaguar)
					<i>R. parkeri</i>

Filoni et al., 2012	Brasil	<i>Leopardus pardalis</i>	<i>E. canis</i>	IFA	1/15
André et al., 2012	Brasil	<i>Puma concolor</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	4/8
					Seq.(2) 98% <i>E. chaffeensis</i> (1) 98% <i>E. canis</i>
		<i>Leopardus tigrinus</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	6/25
					Seq.(3) 98% <i>E. chaffeensis</i> (2) 98% <i>E. canis</i>
		<i>Leopardus pardalis</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	4/15
					Seq.(1) 98% <i>E. canis</i>
		<i>Puma yagouarondi</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	3/19
			Seq.(1) 98% <i>E. chaffeensis</i> (2) 98% <i>E. canis</i>		
		<i>Panthera tigris</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	1/8
					Seq.(2) 98% <i>E. chaffeensis</i>
		<i>Panthera leo</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>	PCR	3/12
					Seq.(1) 98% <i>E. chaffeensis</i> (2) 98% <i>E. canis</i>
		<i>Leopardus tigrinus</i>	<i>Anaplasma spp.</i>	PCR	4/25
					Seq.(4) 98% <i>A. phagocytophilum</i>
Tateno et al., 2013	Japão	<i>Prionailurus iremotensis</i>	<i>E. canis</i>	n-PCR	4/33
					Seq. (4) 99,9% <i>E.canis</i>



<i>Prionaiuluru s bengalensis euptilura</i>	<i>E. canis</i>	n-PCR	1/13
		Seq. (1)	99,9% <i>E.canis</i>
	<i>A. bovis</i>	n-PCR	2/13
		Seq. (2)	99,9% <i>A. bovis</i>

IFA = imunofluorescência indireta; PCR = reação em cadeia pela polimerase; qPCR = PCR em tempo real; n-PCR = nested PCR; Seq. = sequenciamento; (n) = nº de sequenciadas.

\* Após a reclassificação ocorrida em 2011, *E. equi* passou a ser o *A. phagocytophilum*.

\*\* *Ehrlichia* com cepas ainda não identificadas, encontrada no Japão e na Rússia.

Os felinos podem ser infectados durante o repasto sanguíneo dos vetores (Allison and Little, 2013). É pouco usual carrapatos parasitarem gatos devido aos hábitos de auto higienização desses animais, que retiram com a boca os parasitos maiores. Mesmo assim, o parasitismo pode ocorrer, principalmente em animais debilitados ou em ambientes com grandes concentrações de animais parasitados (Dantas-Torres and Otranto, 2014a; Segura et al., 2014b). Sugere-se, ainda, que haja outras formas de contágio, como a ingestão destes parasitos e/ou pela ingestão de roedores contaminados (Segura et al., 2014b). É comum encontrar carrapatos em felinos selvagens, principalmente quando transitam por ambientes rurais contaminados por esses artrópodes, sendo usual que os parasitos recolhidos dos felídeos estejam contaminados por agentes rickettsiales (Widmer et al., 2011; Soares et al., 2015).

## 1. Principais agentes rickettsiales com ocorrência no Brasil

### 1. 1. *Rickettsia rickettsii*

Dentre as rickettsioses, a *R. rickettsii* é a mais patogênica, sendo o principal agente causador da Febre Maculosa no ser humano. Já foi descrita sua ocorrência em vários países das Américas, inclusive no Brasil (Labruna, 2009; Parola et al., 2013). A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (nos EUA) ou Febre Maculosa Brasileira (no Brasil) também pode ser causada pela *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, '*R. amblyommii*' e "*Candidatus R.*

*andeanae*” (Labruna, 2009). O humano se infecta quando é picado por carrapatos infectados, que inoculam a rickettsia junto com sua saliva. Contudo, para que a transmissão ocorra é necessário um tempo entre 4h a 6h de aderência e repasto sanguíneo (Brasil, 2016).

Diversas espécies de carrapatos podem servir como vetores, sendo os principais vetores nos Estados Unidos os carrapatos das espécies *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* e, na América do Sul, o *Amblyomma sculptum* (pertencente ao complexo *A. cajennense*). No Brasil, além do *A. sculptum*, também já foi descrito o *A. aureolatum*, *A. ovale* e o *Rhipicephalus sanguineus* como vetores (Labruna, 2009; Brasil, 2016; Brites-Neto et al., 2018). Os carrapatos são considerados reservatórios, fazendo a transmissão transovariana e transestadial, tornando-se infectados por toda a vida. Entretanto já foi demonstrado que esses agentes são patogênicos também para seus vetores, reduzindo a manutenção de carrapatos infectados na natureza. Esse fato explica porque mesmo em regiões onde há alta infestação por carrapatos em humanos e animais, os casos de Febre Maculosa ainda são escassos (Labruna, 2009; Parola et al., 2013). A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o gambá (*Didelphis* sp.) são os principais hospedeiros amplificadores na natureza, enquanto o cavalo é de grande importância no meio rural ou em regiões onde as capivaras não são encontradas (Labruna, 2009; De Oliveira et al., 2016; Brites-Neto et al., 2018).

Os primeiros relatos de Febre Maculosa em humanos datam de 1920 e, desde a década de 1980, os casos registrados vêm aumentando. Em 2001 tornou-se uma doença de notificação obrigatória, o que contribuiu para o melhor monitoramento dos casos, bem como alertou os agentes de saúde para a doença estar inclusa em diagnósticos diferenciais (Labruna, 2009; Parola et al., 2013). A região Sudeste, a mais desenvolvida no Brasil, foi a que mais notificou casos entre os anos de 2000 e 2018 (1853 casos) (Brasil, 2020a), com taxa de óbito de 34,5% (Brasil, 2020b). Esses dados também trazem o questionamento sobre o sub-diagnóstico nas demais regiões do país (Labruna, 2009; Vieira et al., 2011; Parola et al., 2013). A alta incidência de outras causas com sintomatologia semelhante, como dengue, leptospirose e meningite, pode resultar em suspeita diagnóstica tardia de rickettsioses ou desconsiderar a doença (Parola et al., 2013).

Em humanos, a doença pode apresentar-se de forma subclínica, branda ou ser letal. Os sinais clínicos iniciais são inespecíficos (febre, mal-estar, cefaleia, mialgia, vômito). A forma clássica da doença progride para exantemas, principalmente em membros inferiores,

região palmar e plantar. Os exantemas podem evoluir para petéquias, equimoses e sufusões, podendo até mesmo levar à necrose tecidual. Nos casos mais graves também podem ocorrer edema de membros inferiores, hepatoesplenomegalia, disfunções renais, dor abdominal, diarreia, tosse, edema pulmonar, pneumonia, efusão pleural, meningite, meningoencefalite, hemorragias. Quando não tratada adequadamente a letalidade pode chegar a 80% (Brasil, 2016).

Não há relatos de Febre Maculosa em felídeos, entretanto, sabe-se que esses animais podem estar infectados por rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (Widmer et al., 2011; Soares et al., 2015; Pennisi et al., 2017; Mazzotti et al., 2018). Um estudo com amostras de sangue de gatos não mostrou correlação entre sinais clínicos e resultados positivos na PCR para *R. rickettsii* (Bayliss et al., 2009).

### **1.2. *Rickettsia parkeri***

A *R. parkeri* pertence ao Grupo da Febre Maculosa e é um dos agentes causadores da febre maculosa em humanos, porém os sinais clínicos são mais brandos (Spolidorio et al., 2010; De Oliveira et al., 2016).

No Brasil, a *R. parkeri* cepa Mata-Atlântica está presente e é semelhante filogeneticamente com a *R. parkeri*, *Rickettsia africae* e *Rickettsia sibirica*. Os principais vetores são o *Amblyoma triste* (Labruna, 2009; Spolidorio et al., 2010; Parola et al., 2013), *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e o *Rhipicephalus sanguineus* (Parola et al., 2013; De Oliveira et al., 2016). Ao contrário do que ocorre com a *R. rickettsii*, os carrapatos tornam-se altamente infectados por esses agentes, tornando-se também reservatórios (Labruna, 2009). Já foi relatada a sorologia positiva para *R. parkeri* em gatos domésticos e selvagens (Widmer et al., 2011; Mendes et al., 2019).

### **1.3. *Rickettsia felis***

A *R. felis* pertence ao Grupo de Transição da ordem das Rickettsiales, pois filogeneticamente está em um clado entre o Grupo da Febre Maculosa e o Grupo do Tifo (Blanton and Walker, 2017). De ampla distribuição, já foi descrita em diversos países, exceto Antártica (Labruna, 2009; Brown and Macaluso, 2016).

O principal vetor da *R. felis* é a pulga do gato, *Ctenocephalides felis*, entretanto já foram descritas como transmissoras outras espécies de pulgas, carrapatos, mosquitos e

camundongos (Brown and Macaluso, 2016; Lappin et al., 2020). As vias de transmissão das bactérias nos vetores ainda necessitam de mais esclarecimentos. Já está estabelecido que ocorre a transmissão transovariana e transestadial, fazendo da pulga também um reservatório, uma vez que perpetua a manutenção da bactéria na população de vetores. É observado que pulgas tornam-se infectadas no parasitismo de vertebrados não rickettsêmicos, instigando estudos de novas formas de infecção desses vetores. O repasto sanguíneo simultâneo de dois ou mais vetores é capaz de fazer a transmissão da bactérias entre eles, sendo o vertebrado parasitado apenas um condutor da *R. felis*, não um reservatório. Esse novo modo de transmissão foi denominado de “co-feeding” e pode acontecer tanto entre pulgas da mesma espécie (*C. felis*) quanto entre espécies diferentes (*C. felis* e *Xenopsylla cheopis*). Em laboratório onde as pulgas se alimentavam em meios artificiais, a transmissão pelo "co-feeding" foi capaz disseminar a infecção ao longo de 4 semanas, demonstrando o quanto esse modo de transmissão pode ser importante. Também foi proposto que larvas possam se contaminar quando em contato com as fezes de pulgas infectadas. Pulgas adultas expostas experimentalmente à cepas de *R. felis* LSU e LSU-b tornaram-se infectadas, entretanto o mesmo não ocorreu quando expostas à "*R. felis*-like organisms" - RFLO (Brown and Macaluso, 2016; Blanton et al., 2019). Estudos na América do Sul com *C. felis* demonstram que até 90% podem estar contaminadas, indicando que a *R. felis* não seja patogênica para as pulgas (Horta et al., 2005; Labruna, 2009).

Pulgas contaminadas já foram capturadas não somente em gatos, mas também em cães, roedores, gambás, cavalos, porcos-espinhos, ovelhas, cabras, macacos e gerbils (Brown and Macaluso, 2016). Não se sabe como ocorre a infecção dos hospedeiros vertebrados. Grande parte das rickettsias são transmitidas pela inoculação de saliva ou de fezes contaminadas, mas não se sabe o que ocorre com a *R. felis* (Brown and Macaluso, 2016; Blanton and Walker, 2017). Uma suposição é que a infecção ocorra pela ingestão de pulgas ou pelo contato de pele ou mucosas com as fezes contaminadas (Labruna, 2009). Essa lacuna no ciclo da *R. felis* ainda necessita ser esclarecida (Brown and Macaluso, 2016; Blanton and Walker, 2017).

A *R. felis* causa a Febre Maculosa transmitida pela pulga, incriminada como importante causadora de febre em humanos na África (Brown and Macaluso, 2016). Os primeiros casos da doença foram relatados em 1991, um ano após o isolamento e

identificação da bactéria. Os sinais clínicos são febre, dor de cabeça, dores musculares e máculas pelo corpo (Segura et al., 2014a; Brown and Macaluso, 2016). Entretanto, pacientes saudáveis com resultados de PCR positiva para o DNA de *R. felis* e ausência de anticorpos para a bactéria colocam em dúvida a real ação desse agente rickettsial no organismo humano. Uma hipótese é que o *Plasmodium* spp. seja a causa dos sinais clínicos nesse pacientes e que a *R. felis* seja um achado acidental (Blanton and Walker, 2017).

Os sinais clínicos e o grupo de risco para Febre Maculosa da Pulga (*R. felis*), Tifo Murino (*R. typhi*) e Malária costumam ser os mesmos, de pessoas de baixa renda que habitam áreas com infestação de pulgas e mosquitos. Uma vez que o diagnóstico definitivo requer testes moleculares e os sinais clínicos se confundem, é certo que haja diagnósticos errôneos entre as três enfermidades (Silva and Papaiordanou, 2004; Brown and Macaluso, 2016).

Gatos infectados soroconvertem cerca de quatro meses após a exposição, entretanto a bacteremia é fraca e a detecção do DNA da rickettsia pela PCR costuma ser transitória (Labruna, 2009; Segura et al., 2014a). Estudos não sustentam que a *R. felis* seja capaz de causar doença clínica nos gatos (Bayliss et al., 2009; Segura et al., 2014a; Quorollo, 2019; Lappin et al., 2020). Não há dados sobre a doença em felídeos silvestres.

#### **1.4. *Rickettsia typhi***

A ocorrência de *R. typhi* é relatada no Brasil desde 1948 (Silva and Papaiordanou, 2004), entretanto não há estudos epidemiológicos robustos sobre sua ocorrência (Labruna, 2009). O vetor é a pulga *Xenopsylla cheops*, que contamina o seu hospedeiro pela inoculação das fezes contaminadas quando o vertebrado se coça (Brown and Macaluso, 2016; Blanton and Walker, 2017; Pennisi et al., 2017). A pulga do gato, *Ctenocephalides felis*, também já foi documentada como vetor, colocando os felídeos como potenciais hospedeiros vertebrados para a *R. typhi* (Blanton and Walker, 2017; Pennisi et al., 2017). A transmissão transovariana é rara (Silva and Papaiordanou, 2004; Blanton and Walker, 2017). O seu hospedeiro reservatório é o rato (*Rattus* sp.), um animal muito comum em grandes centros urbanos do país, que comumente está infectado por pulgas (Silva et al., 2014).

A *R. typhi* é o agente causador do Tifo Murino, cujos sinais clínicos são variáveis, podendo haver febre alta e persistente, calafrios, dor de cabeça e no corpo, exantema maculopapular difuso, confusão mental e delírios. Os casos podem evoluir para hemorragias e até a morte. Esses sinais clínicos podem ser confundidos com os sinais de outras doenças mais evidentes, como dengue hemorrágica. Ademais, os laboratórios de referência do país disponibilizam testes sorológicos para as rickettsias do Grupo da Febre Maculosa, que não fazem reação cruzada com as rickettsias do Grupo do Tifo, fatores que podem levar ao subdiagnóstico de casos de Tifo Murino no Brasil (Silva and Papaiordanou, 2004; Labruna, 2009).

Não há relatos da ocorrência de *R. typhi* em felinos silvestres, entretanto em gatos domésticos existe relato da presença do agente, mas é incerto sua patogenicidade (Nogueras et al., 2013; Lappin et al., 2020).

### **1.5. *Rickettsia bellii***

A *R. bellii* já foi isolada em diversas espécies de carrapatos no Brasil, tais como *Amblyomma ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. scalpturotum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. nodosum*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (Parola et al., 2013; Coelho et al., 2016). A *R. bellii* não está associada à doenças em humanos (Coelho et al., 2016) e ainda não há relatos de sua ocorrências em felídeos.

### **1.6. *Rickettsia rhipicephali***

Há relatos de carrapatos (*Haemaphysalis juxtakochi*) infectados por *R. rhipicephali* (Labruna, Pacheco, et al., 2007; Zeringota et al., 2017), bem como cães sororeagentes para o agente no Brasil (Labruna, Horta, et al., 2007). Entretanto não está certo qual seu papel patogênico nos vertebrados (Parola et al., 2013). Não há relatos de sua ocorrências em felídeos.

### **1.7. *Rickettsia monteiroi***

A *R. monteiroi* infecta carrapatos da espécie *A. incisum*, comum na Mata Atlântica brasileira. A patogenicidade dessa bactéria não está esclarecida (Parola et al., 2013) e não há relatos de sua ocorrência em felídeos.

### 1.8. *Anaplasma phagocytophilum*

O *Anaplasma phagocytophilum* tem distribuição mundial, infectando humanos e animais, com alta prevalência na América do Norte onde é considerada o principal *Anaplasma* que infecta felinos. No Brasil, entretanto a principal espécie descrita em gatos é o *Anaplasma platys* (Pennisi et al., 2017). Até 2001, acreditava-se que haviam duas espécies distintas pertencentes à família das Ehrlichias, a *E. phagocytophila* (febre do Carrapato bovina) e a *E. equi* (Ehrlichiose Granulocítica Equina e Humana), que hoje sabe-se ser uma única espécie, o *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler et al., 2001).

O seu vetor é o carrapato, sendo o *Ixodes scapularis* o principal nos EUA (Ogden et al., 2002b; Galemor et al., 2018), mas no Brasil acredita-se que o *Rhipicephalus sanguineus* desempenha importante papel (Silveira et al., 2017). A transmissão é transestadial, não ocorrendo transmissão transovariana (Ogden et al., 2002a).

A bactéria infecta granulócitos, principalmente neutrófilos e por vezes eosinófilos, onde se reproduz formando colônias denominadas mórulas (Brouqui and Matsumoto, 2007; Allison and Little, 2013).

O *Anaplasma phagocytophilum* é o agente etiológico da anaplasmoze granulocítica humana. Os principais achados clínicos são febre, trombocitopenia, leucopenia e aumento das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Outros sinais clínicos que já foram relatados em humanos foram mialgia, cefaleia, mal-estar, náusea, vômito, diarreia, tosse, dor articular, erupções cutâneas, torcicolo, confusão mental (Perez et al., 1996; Dumler et al., 2007).

Em gatos domésticos a infecção está associada a sinais clínicos inespecíficos como febre, anorexia, letargia e desidratação. Já foi relatado claudicação, edema articular, epistaxe e dor abdominal. Não está estabelecido se esses sinais realmente ocorrem em decorrência da infecção (Gorna et al., 2013; Pennisi et al., 2017; Galemor et al., 2018; Lappin, 2018; Guimaraes et al., 2019).

Já foi relatada a ocorrência de *A. phagocytophilum* em Suçuarana (*Puma concolor*) nos EUA (Foley et al., 1999). Ryeser-Degiorgis et al. (2005) encontraram sorologia positiva em amostras de sangue de Lince (*Lynx linx*), entretanto, a PCR do tecido desses animais foi negativa. André et al. (2012) realizaram análise filogenética em amostras de sangue de gatos-do-mato (*Leopardus tigrinus*) na clade do *A. phagocytophilum*.

### **1.9. *Anaplasma platys***

O *Anaplasma platys* tem distribuição mundial, infectando principalmente os cães. Foi considerado uma espécie de Ehrlichia (*E. platys*) até 2001, quando passou a ser considerado mais uma espécie da família Anaplasma (Dumler et al., 2001). Seu vetor é o carrapato das espécies *R. sanguineus*, *Ixodes scapularis* e *A. auratus*. O agente infecta plaquetas, podendo causar a trombocitopenia cíclica canina. Apesar de já haver relatos da ocorrência natural em gatos (Hegarty et al., 2015; Lappin, 2018), ainda não está estabelecido se é capaz de causar doença clínica nesta espécie (Allison and Little, 2013; Maggi and Kramer, 2019). Em felinos silvestres não há relatos sobre a ocorrência.

### **1.10. *A. bovis***

A bactéria tem ampla distribuição, sendo relatada no Brasil, América do Norte, Japão e África (Rymaszewska and Grenda, 2008). Seu vetor é o carrapato, sendo encontrada no *Amblyomma sculptum*, *Hyalomma sp.* e *A. variegatum*. Infecta monócitos, causando a doença conhecida como Anaplasmosse Monocítica Bovina. Os principais sinais clínicos no gado são letargia, perda de peso, febre, linfadenomegalia e pode levar bezerros jovens a óbito. As alterações laboratoriais incluem leucocitose por monocitose (com presença de vacúolos citoplasmáticos) e eosinopenia (Rymaszewska and Grenda, 2008; Melo Junior et al., 2010). Há relatos da ocorrência natural de *A. bovis* em gatos domésticos (Oliveira et al., 2018). No Japão, foi relatada a ocorrência natural em gato-de-Iremote (*Prionailurus iriomotensis*) e em gato-leopardo-Tsushima (*Prionailurus bengalensis euphilura*) (Tateno et al., 2013).

### **1.11. *A. marginale***

O *A. marginale* tem grande importância econômica uma vez que transmite a Anaplasmosse Eritrocitária Bovina, causando perdas nos rebanhos de gado em regiões acometidas, como no Brasil (Rymaszewska and Grenda, 2008; Picoloto et al., 2010). A bactéria acomete ruminantes e tem como principal vetor o carrapato *Rhipicephalus microplus* (Kessler, 2001). O *A. marginale* faz parasitismo intra-eritrocitário, causando anemia, febre, icterícia, anorexia, perda de peso e abortos nos bovinos (Picoloto et al., 2010). O agente também já foi diagnosticado em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) no Pantanal brasileiro (Picoloto et al., 2010). Não há relatos da sua ocorrência em felídeos.



### 1.10. *Ehrlichia canis*

A *E. canis* é uma bactéria cosmopolita, sendo considerada endêmica em diversas regiões do Brasil, como Alagoas, Ceará, Pernambuco e Mato Grosso. Seu principal vetor é o *R. sanguineus* em áreas urbanas e os carrapatos do complexo *A. cajennense* em áreas rurais (Vieira et al., 2011).

A bactéria infecta monócitos, macrófagos e linfócitos dos vertebrados acometidos (Allison and Little, 2013). Já foi relatado *Ehrlichia canis* em humanos, porém, foi pouco investigada (Perez et al., 1996; Dumler et al., 2007). Em cães, é o agente etiológico da Ehrlichiose Monocítica Canina, doença de grande importância clínica em todo o país. Seu ciclo é dividido em três estágios: aguda, subclínica e crônica. A fase aguda perdura de 2 a 4 semanas e cursa em apatia, anorexia, febre, perda de peso, vômito, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. São observados anemia, leucopenia e trombocitopenia. Alguns cães podem desenvolver cardiomiopatia. A fase subclínica inicia-se de 6 a 9 semanas após a infecção, sendo observado anemia, leucopenia e trombocitopenia. Alguns animais apresentam epistaxe, petéquias e máculas hemorrágicas em decorrência da trombocitopenia. A fase crônica ocorre quando o sistema imune do animal não é capaz de debelar a infecção, podendo acarretar em hipoplasia e aplasia medular, com consequente óbito do paciente (Vieira et al., 2011).

A *E. canis* já foi relatada em gatos, entretanto é bem mais rara do que em cães (Almosny et al., 1998; Breitschwerdt et al., 2002; Oliveira, L. S. D. et al., 2009; Hegarty et al., 2015). Acredita-se que a *Ehrlichia* que infecta os gatos seja um tipo diferente da que infecta cães e muitos autores a citam como “*Ehrlichia canis-like*” (Perez et al., 1996; Breitschwerdt et al., 2002; Lappin, 2018). O primeiro relato de ehrlichiose de ocorrência natural em gatos é datado de 1986, na França. Posteriormente, outros relatos nos quais gatos apresentavam mórulas em esfregaços sanguíneos semelhantes à *Ehrlichia* foram publicados no Quênia, EUA, Suíça e no Brasil (Breitschwerdt et al., 2002). Almosny et al. (1998) fizeram o primeiro relato de ehrlichiose felina no Brasil, diagnosticado pela observação de mórulas em linfócitos. Os gatos apresentavam febre, apatia, anorexia, mucosas hipocoradas e desidratação. As alterações observadas no hemograma foram anemia normocítica normocrômica e leucopenia. Posteriormente, Oliveira et al. (2009a) relataram o primeiro diagnóstico por meio da PCR de sangue três gatos infectados por *E. canis* na América do Sul,

e encontraram trombocitopenia em um dos gatos infectados. Entretanto, Correa et al. (2011) não encontraram anormalidades séricas correlacionadas com a presença desses agentes. Esses sinais são semelhantes aos encontrados na ehrlichiose canina, porém, presentes também em inúmeras outras afecções (Dantas-Torres and Otranto, 2014b; Segura et al., 2014a).

Em felídeos silvestres já foi detectada a soropositividade para *E. canis* pela IFA em suçuarana (*Puma concolor*) (Filoni et al., 2006) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Filoni et al., 2012). André et al. (2010) encontraram resultados positivos para *E. canis* por PCR em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*), gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*), suçuarana (*Puma concolor*) e onça (*Panthera onca*), entretanto, análise filogenética sugeriu se tratar de alguma nova espécie de Ehrlichia. Widmer et al (2011) também encontraram resultados positivos na PCR em onças do Pantanal mato-grossense, entretanto a análise filogenética indicava apenas uma aproximação do cluster de *E. ruminantium*.

### **1.11. *Ehrlichia ewingii***

A *E. ewingii* tem ocorrência mais rara no Brasil do que a *E. canis*, mas assim como as demais ehrlichias, seu principal vetor é o *R. sanguineus* e os carrapatos do complexo *A. cajennense* (Vieira et al., 2011). Infecta neutrófilos e eosinófilos dos hospedeiros vertebrados (Allison and Little, 2013).

Em humanos pode causar a Ehrlichiose (granulocítica) Humana Ewingii, uma doença rara. Em cães pode causar febre, anemia, poliartrite, trombocitopenia e distúrbios neurológicos (Dumler et al., 2001; Oliveira, L. S. et al., 2009; Allison and Little, 2013). No Brasil, Oliveira et al. (2009b) fizeram o primeiro relato da detecção de DNA de *E. ewingii* em amostras de sangue de cães. Hegarty et al. (2015) relataram a ocorrência natural de *E. ewingii* em 3 gatos domésticos. Em felídeos silvestres a ocorrência natural de *E. ewingii* ainda não foi documentada (Vieira et al., 2011).

### **1.12. *Ehrlichia chaffeensis***

A *E. chaffeensis* tem grande importância como zoonose, sendo encontrado na América do Norte, México, Argentina, Venezuela e Brasil. Seus principais vetores no Brasil

são os carrapatos do complexo *A. cajennense*, *A. triste*, *Anocentor nitens* e o *Rhipicephalus microplus* (Machado et al., 2006).

A bactéria infecta principalmente ruminantes. Em humanos, causa a Ehrlichiose Monocítica, doença de grande importância clínica em algumas regiões do EUA. No Brasil já foi relatado a ocorrência em humanos no estado de Minas Gerais. O principal sinal clínico é a febre, mas os casos podem evoluir para dor de cabeça, vômito, mialgia, conjuntivite, insuficiência respiratória e insuficiência renal (Vieira et al., 2011). É a mais patogênica das ehrlichioses, podendo ser fatal nos casos mais graves e em pessoas imunocomprometidas (Machado et al., 2006; Harvey et al., 2017). Segundo Vieriera et al. (2011), é possível que esses casos descritos no Brasil tenham sido atribuídos erroneamente à *E. chaffensis*, pois o teste utilizado nos pacientes é a IFA que pode fazer reação cruzada com *E. canis*, ehrlichiose de grande ocorrência em cães domésticos no país.

Em gatos já foi relatada a ocorrência natural de *E. chaffensis* (Braga et al., 2012; Hegarty et al., 2015). André et al. (2012) relataram a ocorrência em suçuarana (*Puma concolor*), jaguarundi (*Puma yagourundi*), tigre (*Panthera tigris*), leão (*Panthera leo*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

## **2. Métodos diagnósticos para agentes rickettsiales**

### **2.1. Hematologia e bioquímica sérica**

As alterações observadas no hemograma e nos exames bioquímicos são inconclusivas para o diagnóstico dos agentes rickettsiales em felinos. Autores sugerem que as ehrlichioses - doenças causada por Ehrlichias e Anaplasmas (Dumler et al., 2007) - devam ser incluídas no diagnóstico diferencial de gatos com trombocitopenia (Braga et al., 2012; Qurollo, 2019), anemia, leucopenia (Almosny et al., 2002; Qurollo, 2019), hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e monocitose (Qurollo, 2019). Entretanto, alguns autores não encontraram correlação entre a parasitemia e alterações laboratoriais (Correa, Elisabete S et al., 2011).

### **2.2. Microscopia óptica**

O uso da microscopia óptica de amostras de sangue e de outros tecidos é bem reportada para o diagnóstico das Anaplasmatáceas em cães, mas pouco relatada em outros animais. Amostras de sangue periférico pode permitir a visualização das mórulas, mas nem

sempre é possível, pois depende do estágio da infecção que o animal se encontra (Allison and Little, 2013; Pennisi et al., 2017; Lappin, 2018). As mórulas dos anaplasmas e das ehrlichias são vacúolos citoplasmáticos nos quais as bactérias estão se reproduzindo em fissão binária, medindo aproximadamente 4-6 $\mu$ m de diâmetro, usualmente aparecendo como uma estrutura granular basofílica intracitoplasmática (Allison and Little, 2013). Em gatos, as mórulas de gatos infectados por *A. phagocytophilum* podem ser visualizadas em amostras de sangue periférico após 7 dias de inoculação experimental. Em gatos naturalmente infectados por *A. platys*, a bacteremia é cíclica, acontecendo a recorrência em intervalos de 7-14 dias (Pennisi et al., 2017). Também já foram descritas presenças de mórulas de *E. canis* em neutrófilos e aspirados de tecido (Allison and Little, 2013). Cabe salientar que agentes da família das Rickettsias não fazem mórulas, não sendo possíveis serem visualizados pela microscopia óptica convencional (Portillo et al., 2017).

### **2.3. Imunohistoquímica e imunocitoquímica**

A imunocitoquímica (ICQ) e a imunohistoquímica (IHQ), utilizando anticorpos monoclonal ou policlonal, podem ser utilizadas para identificação dos agentes rickettsiales em amostras de sangue ou tecidos (Allison and Little, 2013; Portillo et al., 2017). A ICQ já foi descrita para identificação de antígenos de *A. platys* em amostras de sangue de cães. A IHQ já foi utilizada para detecção de *A. platys*, *R. rickettsii* e *N. helminthoteca* em tecidos de cães infectados. Essas técnicas são bastante interessantes por serem capazes de conferir diagnóstico antes da soroconversão, entretanto é necessário laboratório e equipe qualificados para a execução (Allison and Little, 2013; Portillo et al., 2017).

### **2.3. Cultura**

A cultura *in vitro* com posterior isolamento bacteriano pode ser eficaz para algumas rickettsiales, mas pode ser de pouco sucesso para outros. Outras desvantagens são que a cultura só pode ser executada em laboratórios especializados de nível 3 de biossegurança, além de ser um exame oneroso, cujo resultado não é rápido e necessita da posterior realização da PCR para correta identificação do agente envolvido (Allison and Little, 2013; Portillo et al., 2017). A cultura também tem limitações a depender do agente que está sendo investigado, não obtendo sucesso para *A. platys* e *E. ewingii*, por exemplo (Portillo

et al., 2017).

Portillo et al. (2017) ressaltam que para agentes da família das Rickettsias, amostras de tecido infectados são melhores para cultivo do que amostras de sangue. Caso seja utilizado sangue a amostra deve ser da fase aguda da doença, coletada entre 3 a 5 dias após seu início (Allison and Little, 2013; Portillo et al., 2017).

#### **2.4. Sorologia**

Os testes sorológicos mais utilizados são a imunofluorescência indireta (IFA) e o teste de imunoabsorção enzimática (ELISA). São testes muito interessantes para serem utilizados como triagem, entretanto, não discriminam espécies e subespécies, além de ser possível a ocorrência de reação cruzada (Allison and Little, 2013; Pennisi et al., 2017). Ademais, podem acusar falso negativo no início da doença; e falsos positivos quando animal ainda tem anticorpos mas já debelou a infecção, não devendo ser utilizado como ferramenta diagnóstica única (Galemore et al., 2018).

Quando se utiliza IFA, alterações de quatro vezes o valor observado na primeira coleta num intervalo de quatro semanas, é considerado uma infecção ativa (Allison and Little, 2013; Pennisi et al., 2017; Portillo et al., 2017).

Recentemente o teste SNAP 4Dx Plus (IDEXX®) desenvolvido para detecção de *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis* e *E. ewingii*. em cães, foi utilizado com sucesso em gatos para a detecção de *A. phagocytophilum*. O teste não é aprovado para uso em felinos, entretanto tem demonstrado ser capaz de identificar anticorpos em gatos infectados com *Anaplasma* e *Ehrlichia* (Hegarty et al., 2015; Galemore et al., 2018).

#### **2.5. Testes moleculares**

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica que amplifica uma sequência do DNA do agente a ser estudado, tendo sido utilizada com bastante eficiência, com resultados comparáveis à cultura, com vantagens de custo e rapidez no diagnóstico das rickettsiales. Por esses motivos, a PCR é o método de eleição para estudos filogenéticos, além de permitir um estudo epidemiológico confiável (Allison and Little, 2013).

A PCR deve ser interpretada com cautela, pois quando se utiliza amostras de sangue o teste só oferecerá resultado positivo se houver rickettsemia. A presença de

rickettsiales no sangue costumam sofrer grandes oscilações ao longo da infecção, sendo mais provável de serem encontradas na fase aguda (Allison and Little, 2013; Portillo et al., 2017). Assim, resultados negativos indicam apenas que a sequência de ácido nucleico não foi detectada na amostra avaliada, não devendo ser interpretada como ausência de infecção (Allison and Little, 2013). Entretanto outros tipos de amostras também podem ser utilizadas, tais como tecidos, líquido cefalorraquidiano ou líquido pleural (Portillo et al., 2017).

A nested-PCR é uma técnica que confere maior sensibilidade do que a PCR convencional, entretanto o risco de contaminação dos *amplicons* também é maior. A PCR em tempo real (qPCR) é outra alternativa interessante à PCR convencional, oferecendo menor risco de contaminação e com melhor sensibilidade (Portillo et al., 2017).

### **3. Tratamento de doenças causadas por agentes rickettsiales**

O tratamento de eleição para infecções por qualquer um dos agentes rickettsiales é a Doxiciclina. Em gatos, a dose preconizada é 5mg/kg por via oral, a cada 12 horas, por 28 dias (Qurollo, 2019). Como alternativa à Doxiciclina, podem ser utilizados antibióticos da classe das fluorquinolonas (Lappin et al., 2020). Em felídeos silvestres pode se fazer o cálculo pelo uso da alometria (Freitas and Carregaroi, 2013). Tratamento de suporte e uso de ectoparasiticidas de contato são indicados (Pennisi et al., 2017; Qurollo, 2019; Lappin et al., 2020).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Vet Clin Pathol**, v. 42, n. 2, p. 127-44, Jun 2013. ISSN 1939-165X (Electronic) 0275-6382 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647393> >.

ALMOSNY, N. R. P. et al. Ehrlichiose clínica em gatos (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998a. ISSN 1413-0130 1984-7130.

\_\_\_\_\_. Ehrlichiose clínica em gatos (*Felis catus*) - Comunicação científica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998b. ISSN 1413-0130 1984-7130.

ALMOSNY, N. R. P. et al. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. LF Livros, 2002.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and Serologic Detection of Ehrlichia spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

ANDRE, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 3, n. 4, p. 247-53, Sep 2012. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749737> >.

BAYLISS, D. B. et al. Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 4, p. 266-70, Apr 2009. ISSN 1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786845> >.

BLANTON, L. S.; QUADE, B. R.; BOUYER, D. H. Differentiation of Rickettsia felis and Rickettsia felis-Like Organisms via Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis.

**Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 19, n. 8, p. 637-639, Aug 2019. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31021302> >.

BLANTON, L. S.; WALKER, D. H. Flea-Borne Rickettsioses and Rickettsiae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 1, p. 53-56, 2017.

BRAGA, I. S. A. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 641-645, 2014.

BRAGA, M. D. S. C. D. O. et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 37-41, 2012.

BRASIL. Febre Maculosa Brasileira e outras rickettsioses. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde: 379-386 p. 2016.

\_\_\_\_\_. Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019\*. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde 2020a.

\_\_\_\_\_. Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2019\*. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde 2020b.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular Evidence Supporting *Ehrlichia canis*-Like Infection in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 642-649, 2002a.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular Evidence Supporting *Ehrlichia canis*-Like Infection in Cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 642-649, 2002b.

BRITES-NETO, J. et al. Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1521-1528, 2018.



BROUQUI, P.; MATSUMOTO, K. ANAPLASMATACEAE AND HUMAN ANAPLASMOSIS AND EHRLICHIOSES - Bacteriology and Phylogeny of Anaplasmataceae. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**: CRC Press, 2007. chap. 13, p.179-198. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9781420019971.

BROWN, L. D.; MACALUSO, K. R. Rickettsia felis, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Curr Trop Med Rep**, v. 3, p. 27-39, 2016. ISSN 2196-3045 (Print). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340613> >.

COELHO, M. G. et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever Rickettsia and Rickettsia bellii in Minas Gerais, Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, n. 3, p. 275-82, Mar 31 2016. ISSN 1972-2680 (Electronic) 1972-2680 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27031460> >.

CORREA, E. S. et al. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos - alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

CORREA, E. S. et al. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Cães, gatos, parasitos e humanos no Brasil: abrindo a caixa preta. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 22, 2014a.

\_\_\_\_\_. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014b.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v. 4, 2011.

DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016. ISSN 1678-9199 (Print) 1678-9180 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555867> >.

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

DUMLER, J. S. et al. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis**, v. 45 Suppl 1, p. S45-51, Jul 15 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582569> >.

DUTRA, F. et al. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 13, p. 433-437, 2001.

ETTEMA, T. J. G.; ANDERSSON, S. G. E. The  $\alpha$ -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Biology Letters**, v. 5, p. 429-432, 2009.

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

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

FILONI, C. et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 1, p. 166-73, Jan 2012. ISSN 1943-4936 (Electronic) 1040-6387 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908268> >.

FOLEY, J. E. et al. Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 703-709, 1999.

FOURNIER, P.-E.; RAOULT, D. RICKETTSIA AND HUMAN RICKETTSIOSES - Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**. 1: CRC Press, 2007. chap. 1, p.5-13. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9780849376115.

FREITAS, G. C.; CARREGAROI, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GALEMORE, E. R.; LABATO, M. A.; O'NEIL, E. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in feral cats in Massachusetts. **JFMS Open Rep**, v. 4, n. 1, p. 2055116917753804, Jan-Jun 2018. ISSN 2055-1169 (Electronic) 2055-1169 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29399369> >.

GORNA, M. et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in a cat. **Veterinarni Medicina**, v. 1, p. 39-43, 2013.

GUIMARAES, A. et al. Molecular detection, characterization of *Anaplasma* spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state. **Acta Trop**, v. 191, p. 239-242, Mar 2019. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30615856> >.

GUIMARAES, A. et al. Ehrlichia spp. infection in domestic cats from Rio de Janeiro State, southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 28, n. 1, p. 180-185, Jan-Mar 2019. ISSN 1984-2961 (Electronic) 0103-846X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30892460> >.

HARVEY, T. V. et al. Babesia spp. and Ehrlichia chaffeensis infection in Dogs from Southeastern Bahia, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, 2017.

HEGARTY, B. C. et al. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 320, Jun 12 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062723> >.

HORTA, M. C. et al. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1166, p. 156-66, May 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538276> >.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 2, p. 249-55, Summer 2007. ISSN 1530-3667 (Print) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627445> >.

LABRUNA, M. B. et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 3, p. 869-73, Feb 2007. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142361> >.

LAPPIN, M. R. Update on flea and tick associated diseases of cats. **Vet Parasitol**, v. 254, p. 26-29, Apr 30 2018. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29657007> >.

LAPPIN, M. R.; TASKER, S.; ROURA, X. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats. 1. Flea-associated diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, p. 31-39, 2020.

LIMA, M. L. F. et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381-385, 2010.

MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.

MAGGI, R. G.; KRAMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 145, Mar 28 2019. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30917860> >.

MAIA, C. et al. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

MAZZOTTI, G. A. et al. Investigação molecular de Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Anaplasma phagocytophilum e Rickettsia spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 528-535, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

MELO JUNIOR, O. A. et al. OCORRÊNCIA DE Anaplasma bovis (Donatien & Lestoquard, 1936, Dumler et al. 2001) NA REGIÃO DE BOM JESUS DO ITABAPOANA, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, 2010. ISSN 1809-6891 1518-2797.

MENDES, J. C. R. et al. Serosurvey of Rickettsia spp. in cats from a Brazilian spotted fever-endemic area. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 28, n. 4, p. 713-721, Oct-Dec 2019. ISSN 1984-2961 (Electronic) 0103-846X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31721931> >.

NOGUERAS, M. M. et al. Molecular detection of Rickettsia typhi in cats and fleas. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71386, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940746> >.

OGDEN, N. H. et al. A review of studies on the transmission of Anaplasma phagocytophilum from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 195-202, 2002.

OLIVEIRA, A. C. et al. Molecular detection of Anaplasma bovis, Ehrlichia canis and Hepatozoon felis in cats from Luanda, Angola. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 167, Mar 20 2018. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554946> >.

OLIVEIRA, L. S. et al. First report of Ehrlichia ewingii detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 55-56, 2009.

OLIVEIRA, L. S. D. et al. Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 53-54, 2008.

\_\_\_\_\_. Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 53-54, 2009a.

\_\_\_\_\_. Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 53-54, 2009b.

PAROLA, P. et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 657-702, 2013.

PENNISI, M. G. et al. Anaplasma, Ehrlichia and Rickettsia species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **J Feline Med Surg**, v. 19, n. 5, p. 542-548, May 2017. ISSN 1532-2750 (Electronic) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438088> >.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. Ehrlichia canis-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

PICOLOTO, G. et al. Real time polymerase chain reaction to diagnose Anaplasma marginale in cattle and deer (Ozotoceros bezoarticus leucogaster) of the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 186-188, 2010.

PINTO, A. B. T. et al. Anaplasmatocae em gatos (Felis catus) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1137-1150, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

PORTILLO, A. et al. Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 17, n. 1, p. 23-32, Jan 2017. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055574> >.

QUROLLO, B. Feline Vector-Borne Diseases in North America. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 49, n. 4, p. 687-702, Jul 2019. ISSN 1878-1306 (Electronic) 0195-5616 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30961995> >.

RYMASZEWSKA, A.; GREYDA, S. Bacteria of the genus Anaplasma – characteristics of Anaplasma and their vectors: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 11, p. 573-584, 2008.

RYSER-DEGIORGIS, M. P. et al. Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. **J Wildl Dis**, v. 41, n. 1, p. 58-66, Jan 2005. ISSN 0090-3558 (Print) 0090-3558 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827211> >.

SANTARÉM, V. A.; LAPOSY, C. B.; FARIAS, M. R. D. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005. ISSN 18098215.

SEGURA, F. et al. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 353, 2014a.

\_\_\_\_\_. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 353, 2014b.

SILVA, F. S. et al. Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 1-6, 2014.

SILVA, L. J.; PAPAIOORDANOU, P. M. O. Murine (endemic) typhus in Brazil: case report and review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 283-285, 2004.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 958-962, 2017. ISSN 1678-5150 0100-736X.

SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Exp Appl Acarol**, v. 65, n. 1, p. 125-40, Jan 2015. ISSN 1572-9702 (Electronic) 0168-8162 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273064> >.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

TATENO, M. et al. Molecular epidemiologic survey of *Bartonella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. **J Wildl Dis**, v. 49, n. 3, p. 646-52, Jul 2013. ISSN 1943-3700 (Electronic) 0090-3558 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778615> >.

VIEIRA, R. F. D. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011. ISSN 0103-846X.

VILHENA, H. et al. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 6, 2013.

WIDMER, C. E. et al. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 8, p. 1001-5, Aug 2011. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612532> >.

ZERINGOTA, V. et al. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 8, n. 1, p. 81-89, Jan 2017. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27745888> >.



## INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES DA ORDEM RICKETTIALES EM GATOS DOMÉSTICOS.

**RESUMO.-** As Rickettsiales são uma ordem de bactérias cujos agentes podem causar importantes zoonoses, como a Febre Maculosa e a Ehrlichiose. O gato doméstico será considerado o principal animal de estimação das próximas décadas, tornando-se importante a compreensão de seu papel como hospedeiro desses agentes para que haja a promoção da saúde única. O objetivo do presente estudo foi investigar a infecção natural por agentes da ordem das Rickettsiales em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil. Foram analisadas por meio da PCR amostras de sangue de 101 gatos provenientes de proprietários que levavam seus animais para acompanhamento clínico de rotina (GD, n=46) e de um abrigo para animais com condições sanitárias precárias (GA 2, n=55). Todas as amostras foram testadas em duplicatas para a presença de DNA de agentes das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmatacae e para as espécies de *A. platys* e *A. phagocytophilum*. As amostras foram testadas para FIV e FeLV por meio de kit comercial que utiliza o método de ELISA (SNAP Combo FeLV Ag/FIV Antibody Test - IDEXX® Systems, Portland, USA). Não foram encontrados DNA detectáveis para agentes das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmatacae, tampouco para as espécies *A. platys* e *A. phagocytophilum* em nenhuma amostra de ambos os grupos de gatos. Nos gatos pertencentes ao GD, nenhum animal foi reagente para FIV e 5,45% foi reagente para FeLV; enquanto que no GA, 3,6% foi reagente para FIV e 58,18% foi reagente para FeLV. Os resultados indicam que os gatos não estavam em bacteremia para agentes rickettsiales, talvez por não estarem infectados ou por estarem em fase crônica da infecção.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Rickettsiales*, diagnóstico, reação em cadeia pela polimerase, gatos domésticos.

**ABSTRACT.-** Rickettsiales are an order of bacteria whose agents can cause important zoonoses, such as Spotted Fever and Ehrlichiosis. The domestic cat will be considered the main pet of the next decades, making it important to understand its role as a host of these agents so that there is the promotion of unique health. The aim of the present study was to

investigate the natural infection by agents of the order of the Rickettsiales in domestic cats in the Distrito Federal, Brazil. Blood samples from 101 cats from owners who took their animals for routine check up (GD, n = 46) and a shelter for animals with poorly sanitary conditions (GA, n = 55) were analyzed using PCR. All samples were tested in duplicates for the presence of DNA from agents of the Rickettsiaceae and Anaplasmatacae families and for the species of *A. platys* and *A. phagocytophilum*. The samples were tested for FIV and FELV using a ELISA commercial kit (SNAP Combo FeLV Ag / FIV Antibody Test - IDEXX® Systems, Portland, USA). No detectable DNA was found for agents of the Rickettsiaceae and Anaplasmatacae families, nor for the species *A. platys* and *A. phagocytophilum* in any sample of both groups of cats. In cats belonging to the GD, no animals were reactive for FIV and 5.45% were reactive for FeLV; while in GA, 3.6% was reagent for FIV and 58.18% was reagent for FeLV. The results indicate that the cats were not in bacteremia for rickettsial agents, perhaps because they were not infected or because they were in the chronic phase of the infection.

INDEX TERMS: *Rickettsiales*, diagnose, polymerase chain reaction, domestic cats.

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito Saúde Única é uma estratégia mundial que visa ampliar a multidisciplinaridade em todos os aspectos da assistência à saúde humana, animal e ambiental. Nesse contexto, as zoonoses vetoriais têm grande impacto, uma vez que são consideradas reemergentes (Day, 2011; Dantas-Torres and Otranto, 2014). O aumento na população de gatos criados como animais de estimação nos últimos anos (Brasil, 2015) coloca a espécie em foco, uma vez que diversos agentes causadores dessas doenças já foram relatados na espécie (Day, 2011; Segura et al., 2014).

A ordem Rickettsiales, composta pelas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, compreende algumas alfa-proteobacterias de importância zoonótica causadoras de doenças vetoriais reemergentes em todo o mundo (Day, 2011; Vieira et al., 2011). Agentes da família Rickettsiaceae infectam livremente citoplasma (onde se multiplicam) ou núcleo das células endoteliais dos vertebrados. Nos carrapatos ocorre a transmissão transovariana (transmissão para ovos e larvas) e transestadial (transmissão das larvas para fases subsequentes), favorecendo a infecção por toda a vida e por diversas gerações de carrapatos, sendo considerados reservatórios. Quando o agente infecta pulgas e piolhos a transmissão transovariana não ocorre, sendo apenas vetores, sendo os mamíferos considerados reservatórios (Fournier and Raoult, 2007). Agentes da família Anaplasmataceae multiplicam-se no interior de vacúolos citoplasmáticos e podem formar mórulas nas células de medula óssea, eritrócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e/ou plaquetas dos vertebrados (Brouqui and Matsumoto, 2007).

Infecção por esses agentes já foi bem descrita em humanos e diversas espécies de animais, incluindo o gato doméstico. A infecção dos gatos por agentes das famílias *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* ocorre durante o repasto sanguíneo dos vetores artrópodes (Day, 2011; Allison and Little, 2013). Não há relatos de infecção natural de gatos por *Neorickettsia* e *Wolbachia* (Allison and Little, 2013). A depender da espécie, da metodologia adotada para a investigação e da população estudada, a ocorrência desses agentes é

extremamente variável (Day, 2011; Pennisi et al., 2017; Lappin, 2018; Pinto et al., 2018; Mendes et al., 2019). Autores sugerem que os gatos poderiam ser utilizados como sentinelas para a exposição humana em áreas endêmicas para alguns agentes rickettsiales (Segura et al., 2014; Mendes et al., 2019). Correa et al. (2011) investigaram a presença do DNA de *A. platys* em amostras de sangue de gatos domésticos em Campos do Goytacazes - RJ, sendo detectada em 13,18% das amostras, denotando a importância dos gatos como potenciais reservatórios para esses agentes.

Existem diversas técnicas para detecção das rickettsiales, sendo a microscopia direta, a sorologia e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) as mais utilizadas. A microscopia é um método que pode detectar a presença dos agentes em células durante a fase aguda da infecção, tendo baixa sensibilidade quando comparada aos demais métodos. Os testes sorológicos utilizados são a imunofluorescência indireta (IFA) e o teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), entretanto, eles não discriminam as espécies dos agentes envolvidos. A PCR analisa a presença de sequências do DNA da bactéria, sendo interessante por permitir estudos acerca das espécies e filogenia dos agentes detectados (Allison and Little, 2013).

No Distrito Federal não há estudos sobre ocorrência das espécies de rickettsiales que infectam gatos domésticos. O pouco conhecimento sobre a ação desses agentes nos felinos e a escassez de informações sobre o assunto na literatura, fazem com que esses patógenos raramente estejam inclusos nos diagnósticos diferenciais do médico veterinário, possivelmente sendo sub-diagnosticados. Estabelecer a ocorrência de agentes rickettsiales em gatos domésticos também permite maiores estudos sobre a importância da espécie na transmissão de zoonoses (Day, 2011; Segura et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de infecção natural por agentes da ordem das Rickettsiales em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil, utilizando o método de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do DNA desses agentes em amostras de sangue total. Além disso, foi investigada soropositividade para retrovírus (FIV e FeLV), para avaliar se haveria correlação com a ocorrência dos agentes rickettsiales.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue foram coletadas de 101 gatos domésticos, adultos, machos e fêmeas, sendo que 55 residiam em um abrigo em condições precárias e superpopulação (GA), e 46 residiam em ambiente domiciliar (GD), ambos os grupos provenientes do Distrito Federal - Brasil.

Foi realizada inspeção física em todos os gatos de ambos os grupos. Todos os gatos do GA estavam em escore corporal abaixo do ideal (2, 3 ou 4 na escala de 9 pontos) (Freeman et al., 2011), apresentavam diarreia líquida ou pastosa e estavam parasitados por *Ctenocephalides felis*. Os gatos do GD estavam em escore corporal ideal ou acima do ideal (5, 6 ou 7 na escala de 9 pontos), não apresentavam sinais clínicos de doenças e não havia ectoparasitas em pele ou pêlos.

Foi realizada a contenção física dos gatos, feito tricotomia e antisepsia da região da veia (cefálica, femoral medial, ou jugular) e realizado o garroteamento e punção do vaso, utilizando seringa de 3ml acoplada em agulha 25x7 descartáveis. Foram colhidos cerca de 2ml de sangue de cada gato e acondicionados em tubos com EDTA (para realização de teste para FIV, FeLV, e PCR), identificados e refrigerados para posterior análise laboratorial.

Os testes para o vírus de imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) foram realizados utilizando kit comercial que utiliza o método de ELISA (SNAP Combo FeLV Ag/FIV Antibody Test - IDEXX® Systems, Portland, USA) para detectar o antígeno p27 do FeLV e anticorpos para o FIV. Para a realização do teste utilizou-se sangue total, seguindo as recomendações do fabricante.

Armazenou-se uma parte de cada amostra de sangue a 4° C até à extração de DNA, que foi realizada utilizando kit comercial (Illustra Blood® genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare Technologies, Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20° C para posterior análise por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA do sangue e as análises por meio da PCR foram

realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (LMPM) do Hospital Veterinário da UnB.

Nas PCRs foram utilizados controles negativos e positivos afim de se avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a especificidade da reação, respectivamente. Como controle negativo, foi utilizado água ultra pura (MilliQ®) e como controle positivo foi utilizado DNA de amostras sanguíneas de animais sabidamente infectados com os agentes em questão. Todos os reagentes utilizados eram provenientes do mesmo fabricante (Invitrogen® Brasil Ltda, Vila Guarani, São Paulo, Brasil) e foram processadas no mesmo termociclador (C1000 thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As amostras foram testadas sempre em duplicatas e o método utilizado foi previamente validado (Correa et al., 2011).

Todas as amostras foram submetidas a PCR para testar a qualidade da extração do DNA, utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R (Birkenheuer et al., 2003). Para detecção da presença de DNA de agentes da família Rickettsiaceae (gene *gltA*), foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos CS78 e CS323 (Labruna et al., 2004). Para detecção da presença de DNA de agentes da família Anaplasmataceae (gene 16SR rRNA), foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos EHR16sr e EHR16sd (Maia et al., 2014). Além da investigação das famílias, também foram realizadas PCR para detecção das espécies *A. platys* (oligonucleotídeos PLATYS e EHR16SR) (Inokuma et al., 2000) e *A. phagocytophylum* (oligonucleotídeos MSP3F e MSP3R) (Hegarty et al., 2015). (Tabela 2.1) Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose a 1,5% pela eletroforese e observados no transiluminador fluorescente (UV transilluminator®, UVP LLC, Upland, CA).

O estudo teve autorização da Comissão de Ética para Uso Animal da UnB (CEUA- UnB) (UnB-DOC nº 130988/2015).

Tabela 2.1. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliação da qualidade da extração do DNA (GAPDH\*) e para identificação de agentes das famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, e das espécies *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum*, em amostras de sangue de felinos domésticos.

PCR	Sequência de oligonucleotídeos e pares de base	Produto	Referência
GAPDH	GAPDH-R: CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T GAPDH-F: CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC	400pb	Birkenheuer, 2003
Anaplasmataceae	EHR16SD: TAG CAC TAC TCG TTT ACA GC EHR16SR: GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC	345pb	Maia et al, 2014
Rickettsiaceae	CS-78: GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT CS-323: GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T	401pb	Labruna et al, 2004
<i>A. platys</i>	PLATYS: GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG EHR16SR: GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC	678pb	Inokuma et al., 2000
<i>A. phagocytophilum</i>	MSP3F: TGG TGG TGC GGG ATA TTT CTA TGT GCC C MSP3R: AAT CCG AGG ATC AGG TGT G	179pb	Hegarty et al., 2015

\*GAPDH = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase





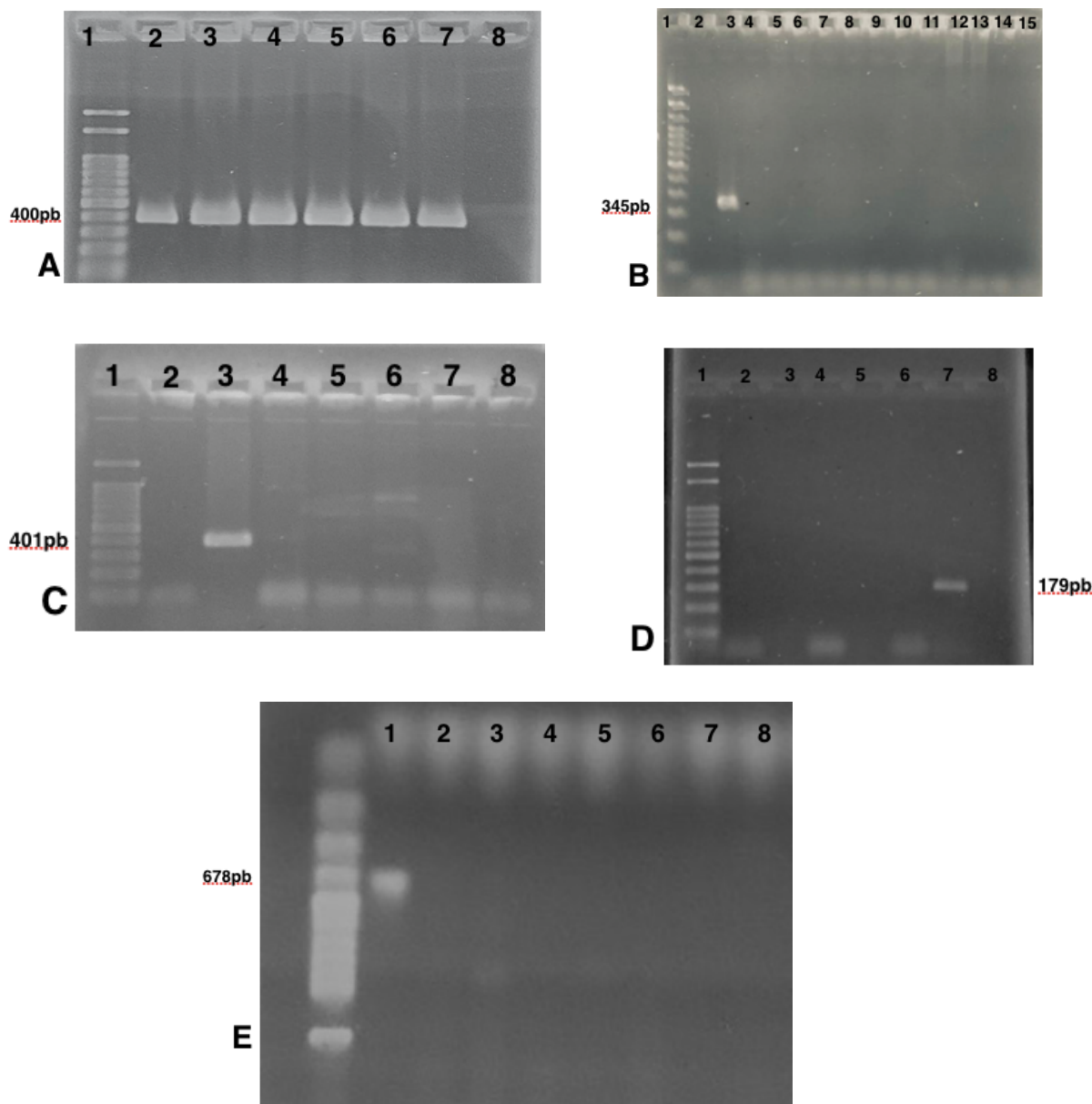


Figura 2.1. Eletroforese dos produtos da PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos, em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) para a detecção de DNA de agentes Rickettsiales em sangue de gatos domésticos. A. Amplificação do gene GAPDH (GAPDH-F e GAPDH-R, 400pb), sendo (1) Lader, (2) controle positivo, (3-7) animais positivos, (8) controle negativo (água). B. Detecção de DNA da família Anaplasmataceae (EHR16sd e EHR16sr, 345pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos. C. Detecção de DNA da família Rickettsiaceae (CS78 e CS323, 401pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-8) animais negativos. D. Detecção de DNA de *Anaplasma*

*phagocytophilum* (MSP3-R e MSP3-F, 179pb), sendo (1) Lader, (2-6) animais negativos, (7) controle positivo, (8) controle negativo (água). E. Detecção de DNA de *Anaplasma platys* (EHR16sr e Platys, 678pb), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas amostras de sangue de 101 gatos que viviam em condições distintas, em busca da detecção da presença de agentes rickettsiales pela técnica da PCR, entretanto, nenhuma amostra foi positiva. Ensaio baseado em PCR são amplamente utilizados para diagnóstico de infecção por agentes rickettsiales, uma vez que permite determinação da espécie além de possibilitar a realização de análise filogenética. Entretanto, há limitações tanto da técnica em si, tanto pelos contaminantes, extração de material genético adequada, entre outros, quanto do ciclo que o agente faz no hospedeiro, pois é necessário que esteja em bacteremia para que haja a detecção dos agentes (Allison and Little, 2013). Segundo Allison & Little (2013), resultados negativos indicam apenas que a respectiva sequência de ácido nucleico não foi detectada na amostra avaliada nas condições de ensaio utilizadas, não devendo ser interpretada como ausência de infecção.

A localização geográfica a ser estudada é outro fator a ser considerado, por existirem áreas onde a ocorrência de certos agentes é mais rara enquanto outras são consideradas endêmicas (Labruna, 2009; Vieira et al., 2011; Brasil, 2020). Contudo, estudos prévios realizados em nosso laboratório com amostras de sangue de felídeos selvagens da mesma região do presente estudo (DF e GO), mostrou bacteremia de *A. platys* detectável pela PCR em 64,7% dos animais, havendo coinfeção em 5,8% com *A. phagocytophilum* e em 5,8% com *E. canis* (Mazzotti et al., 2018). Esses resultados evidenciam que ocorre a presença de agentes rickettsiales na região estudada.

O resultado de todas amostras testadas serem negativas, poderia ser pelo fato de que os animais estariam infectados, porém em fase crônica, quando a bacteremia para esses agentes tende a ser muito discreta tornando-se transitória ou indetectável pela PCR (Labruna, 2009; Allison and Little, 2013; Segura et al., 2014; Soares et al., 2015; Pinto et al., 2018). Um fator que corroboraria a hipótese de bacteremia baixa em fase crônica de infecção é o fato de os gatos do GA estarem parasitados por pulgas, o vetor da *R. felis* e *R. typhi*. Em gatos, não está bem estabelecido como os agentes rickettsiales se comportam, mas estudos demonstram

que o número de animais soropositivos costuma ser maior, por vezes mais que o dobro, do que o número de bacterêmicos (Bayliss et al., 2009; Braga et al., 2012; Braga et al., 2014; Segura et al., 2014; Brown and Macaluso, 2016; Pinto et al., 2018). Guimarães et al. (2019) encontraram 26,4% das amostras de sangue de gatos do RJ soropositivas para *E. canis*, das quais apenas 1,4% foram também positivas pela PCR. Na Espanha, Segura et al. (2014) avaliaram amostras de sangue de gatos para *Rickettsia* sp., encontrando 27,5% soropositivas e apenas 10,8% positivas pela PCR. Esses resultados evidenciam o quanto pode ser difícil obter amostras de gatos bacterêmicos.

Contudo, a maior possibilidade para ausência de amostras positivas na PCR, seria de que esses gatos do estudo realmente não estivessem infectados pelos agentes rickettsiales. Essa explicação é pertinente principalmente para os gatos do GD, uma vez que nestes animais não foram observados a presença de vetores (pulgas ou carrapatos). Ademais, esse grupo de animais tinha acesso aos serviços veterinários, estando todos clinicamente saudáveis, e apenas 5,45% foram reagentes para o teste para um dos retrovírus. Por outro lado, os gatos do GA viviam em condições higiênico-sanitárias bastante precárias, parasitados por pulgas, sendo que 61,8% foram reagentes para o teste de um dos retrovírus. Essas condições favoreceriam a ativação de uma infecção crônica pelos agentes rickettsiales, sendo provável que alguns desses gatos fossem positivos pela PCR, caso realmente estivessem parasitados. Sabe-se que os retrovírus são capazes de causar imunossupressão (Macieira et al., 2008; Hartmann, 2012; Costa et al., 2017), causando bacteremia desses agentes e infecção ativa. Essa associação de fatores nos leva a inferir que os gatos do presente estudo, provavelmente não estavam parasitados por agentes rickettsiales.

## 5. CONCLUSÕES

No presente estudo não foram encontradas amostras de sangue de gatos do Distrito Federal positivas para agentes rickettsiales, analisadas pelo método da PCR. Mesmo gatos portadores de retrovírus, com débil estado de saúde geral e parasitados por pulgas, não houve detecção desses agentes. Além da melhor compreensão sobre a presença e a patogenia desses agentes nos gatos, a escolha do método diagnóstico permanece um desafio. A PCR têm limitações importantes em amostras clínicas, uma vez que detecta a infecção somente na fase aguda da doença, podendo acusar falso negativos em gatos infectados. Estudos de ocorrência devem utilizar mais de um método diagnósticos, incluindo PCR e sorologia.

## 6. REFERÊNCIAS

ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Vet Clin Pathol**, v. 42, n. 2, p. 127-44, Jun 2013. ISSN 1939-165X (Electronic) 0275-6382 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647393> >.

BAYLISS, D. B. et al. Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 4, p. 266-70, Apr 2009. ISSN 1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786845> >.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003. ISSN 0095-1137.

BRAGA, I. S. A. et al. Detection of Ehrlichia canis in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 641-645, 2014.

BRAGA, M. D. S. C. D. O. et al. Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 37-41, 2012.

BRASIL. Pesquisa nacional de saúde : 2013 : acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências : Brasil, grandes regiões e unidades da federação /. IBGE. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: 100 p. 2015.

\_\_\_\_\_. Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019\*. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde 2020.

BROUQUI, P.; MATSUMOTO, K. ANAPLASMATACEAE AND HUMAN ANAPLASMOSIS AND EHRLICHIOSES - Bacteriology and Phylogeny of Anaplasmataceae. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**: CRC Press, 2007. chap. 13, p.179-198. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9781420019971.

BROWN, L. D.; MACALUSO, K. R. Rickettsia felis, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Curr Trop Med Rep**, v. 3, p. 27-39, 2016. ISSN 2196-3045 (Print). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340613> >.

CORREA, E. S. et al. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

COSTA, F. V. A. D. et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1531-1536, 2017. ISSN 1678-5150 0100-736X.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v. 4, 2011.

FOURNIER, P.; RAOULT, D. Rickettsia and human rickettsioses – Bacteriology, taxonomy, and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases (Infectious Disease and Therapy)**. 1. NY: Informa Healthcare, 2007. chap. 1, p.1-12.

FREEMAN, L. et al. WSAVA Nutritional Assessment Guidelines. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 7, p. 385-396, 2011.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684-710, Oct 31 2012. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202500> >.

HEGARTY, B. C. et al. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 320, Jun 12 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062723> >.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1166, p. 156-66, May 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538276> >.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004. ISSN 0095-1137.

LAPPIN, M. R. Update on flea and tick associated diseases of cats. **Vet Parasitol**, v. 254, p. 26-29, Apr 30 2018. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29657007> >.

MACIEIRA, D. B. et al. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de

Janeiro--Brazil. **J Feline Med Surg**, v. 10, n. 2, p. 120-9, Apr 2008. ISSN 1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905624> >.

MAZZOTTI, G. A. et al. Investigação molecular de Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Anaplasma phagocytophilum e Rickettsia spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 528-535, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

MENDES, J. C. R. et al. Serosurvey of Rickettsia spp. in cats from a Brazilian spotted fever-endemic area. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 28, n. 4, p. 713-721, Oct-Dec 2019. ISSN 1984-2961 (Electronic) 0103-846X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31721931> >.

PENNISI, M. G. et al. Anaplasma, Ehrlichia and Rickettsia species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **J Feline Med Surg**, v. 19, n. 5, p. 542-548, May 2017. ISSN 1532-2750 (Electronic) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438088> >.

PINTO, A. B. T. et al. Anaplasmataceae em gatos (Felis catus) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1137-1150, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

SEGURA, F. et al. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 353, 2014.

SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Exp Appl Acarol**, v. 65, n. 1, p. 125-40, Jan 2015. ISSN 1572-9702 (Electronic) 0168-8162 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273064> >.

VIEIRA, R. F. D. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011. ISSN 0103-846X.



**ARTIGO PUBLICADO: Pesquisa Veterinária Brasileira 38(3):528-535, 2018.**

Mazzotti G.A., Silva W.A.C., Carneiro F.T., Scalon M.C., Lima M.A., Teixeira M.A., Lima A.C.F. & Paludo G.R. 2018. [**Molecular investigation of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in captive wild felids.**] Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(3):528-535. Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, SGAN 605, Avenida L2, Brasília, DF 70910-900, Brazil. E-mail: giane@unb.br

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE EHRLICHIA CANIS, ANAPLASMA PLATYS,  
ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM E RICKETTSIA SPP. EM FELÍDEOS  
SELVAGENS CATIVOS**

**RESUMO.-** Doenças transmitidas por vetores estão emergindo e reemergindo em todo o mundo, representando um desafio na medicina humana e veterinária. Entre essas doenças estão aquelas causadas pelos agentes da ordem das Rickettsiales, que são bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias, com capacidade de infectar vários animais e seres humanos. As Rickettsiales das espécies *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. são observadas em vacúolos citoplasmáticos de leucócitos e plaquetas. As Rickettsiales da espécie *Rickettsia* spp. infectam livremente citoplasma ou núcleo de células hospedeiras. O objetivo do presente estudo foi investigar a infecção natural por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos no Distrito Federal e Goiás, Brasil. Além disso, também objetivou-se relacionar possíveis alterações hematológicas decorrentes da presença desses agentes. Amostras de sangue de 34 animais foram analisadas por meio da PCR para detecção de presença de DNA desses agentes. O DNA de *Ehrlichia canis* foi detectado em 5,8% (2/34) das amostras, *A. platys* foi detectado 64,7% (22/34), *A. phagocytophilum* foi detectado em 5,8% (2/34). O DNA de *Rickettsia* spp. não foi detectado

em nenhuma amostra. Dois felídeos apresentaram coinfeção por *E. canis* e *A. platys* e dois apresentaram coinfeção por *A. platys* e *A. phagocytophilum*. Não houve diferenças significativas nos dados hematológicos das amostras positivas e negativas. Os dados sugerem que os felídeos selvagens cativos podem servir como potenciais reservatórios para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., a despeito de não ocasionarem alterações hematológicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Investigação molecular, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., felídeos selvagens, cativeiro, *Anaplasma* spp., diagnóstico, PCR, felinos, parasitoses.

**ABSTRACT.** - Vector-borne diseases have been emerging and reemerging all over the world, causing a challenge to veterinary and human medicine. Among these diseases are those caused by agents of the order Rickettsiales, obligatory intracellular Gram-negative bacteria, with ability to infect several animals and humans. Rickettsiales of the species *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. residing in cytoplasmic vacuoles of leukocytes and platelets. Rickettsiales of the species *Rickettsia* spp. freely infect cytoplasm or nucleus of host cells. The aim of the present study was to investigate the natural infection with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in captive wild felids at the Federal District and Goiás, Brazil. In addition, it was also aimed to relate possible changes in hemogram with the presence of these agents. Blood samples from 34 animals were analyzed by PCR to detect the presence of DNA from these agents. The DNA of *Ehrlichia canis* was detected in 5.8% (2/34) of samples. *A. platys* was detected in 64.7% (22/34), *A. phagocytophilum* was detected in 5.8% (2/34). The DNA of *Rickettsia* spp. was not detected in any sample. Two felides presented co-infection with *E. canis* and *A. platys*, and two presented co-infection with *A. platys* and *A. phagocytophilum*. There were no significant differences in hematological data from positive and negative samples. The data suggest that captive wild felids can serve as potential reservoirs for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp., despite hematological abnormalities were not observed.

INDEX TERMS: Molecular investigation, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, captivity, wild felids, *Anaplasma* spp., diagnose, polymerase chain reaction, cats, parasitoses.

## 1. INTRODUÇÃO

A ordem Rickettsiales, composta pelas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, compreende bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias, muito pequenas (0,3 a 2,0µm), pleomórficas, sem motilidade (Dumler et al., 2007; Fournier and Raoult, 2007). Algumas dessas bactérias podem causar danos à saúde tanto dos animais quanto de seres humanos infectados (Vieira et al., 2011). As bactérias *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica são consideradas importantes zoonoses (Soares et al., 2015; Oliveira et al., 2017), bem como o *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* e *E. ewingii* (Vieira et al., 2011).

Já foi relatada a ocorrência de nove agentes da família Rickettsiaceae no Brasil. As espécies que têm como vetores os carrapatos pertencem aos grupos Febre Maculosa (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *candidatus "R. amblyommii"*) e bellii (*R. bellii*). As espécies transmitidas por pulgas pertencem ao grupo de transição (*R. felis*); Grupo do tifo (*R. typhi*) e Grupo Canadensis (*R. monteiroi*) (Almeida et al., 2011; Labruna et al., 2011). As cepas de *rickettsias* já descritas foram Mata Atlântica (ou Bahia), ApPR, COOPERI, NOD, Aranha e Pampulha (Parola et al., 2013). A família Anaplasmataceae compreende os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Neorickettsia* (Dumler et al., 2007). No Brasil, já foram encontradas as espécies *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* (Sacchi et al., 2012), *A. marginale* (Picoloto et al., 2010), *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, todas tendo como vetor o carrapato (Vieira et al., 2011). A espécie *N. risticii*, descrita infectando equinos no Rio Grande do Sul, tem como vetores trematódeos aquáticos (Coimbra et al., 2006).

Poucos trabalhos descreveram a ocorrência desses agentes em felídeos silvestres no país (Filoni et al., 2006; André et al., 2010; Widmer et al., 2011; Andre et al., 2012) (Widmer et al., 2011). No Brasil, Filoni et al. (2006) realizaram o primeiro trabalho buscando a presença de anticorpos para *E. canis* e *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de 21 felídeos silvestres (18 pumas, 2 gatos do mato e 1 jaguatirica) de vida livre provenientes dos biomas Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, cerrado e Pantanal. Utilizou-se a técnica

de imunofluorescência indireta (IFA), obtendo-se 5% das amostras positivas para *E. canis* (1 puma) e nenhuma para *A. phagocytophilum*. Em 2010, André et al. desenvolveram um trabalho mais amplo, utilizando além da IFA, a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificar a presença de DNA de *E. canis* em amostras de sangue de 72 animais (29 jaguatiricas, 14 gatos do mato, 9 onças, 9 pumas, 6 jaguarundi, 3 gatos dos pampas, e 2 gatos maracajá) mantidos em cativeiro, provenientes do estado de São Paulo e de Brasília. Esse estudo resultou em de 7% das amostras positivas na IFA e 15% positivos na PCR. Widmer et al. (2011) pesquisaram anticorpos (IFA) e DNA (PCR) de agentes Rickettsiales em amostras de sangue de 10 onças de vida livre provenientes do Pantanal, não encontrando nenhuma amostra positiva pela PCR, entretanto, 40% foram positivos para *E. canis* e 10% para *R. parkeri* pela IFA. Em 2012, André et al. analisaram amostras de sangue de 99 felídeos cativos, provenientes do estado de São Paulo e Mato Grosso, dos quais 21% foram positivos pela PCR para *Ehrlichia* spp. (6 gatos do mato, 4 jaguatiricas, 4 pumas, 3 jaguarundis, 3 leões e 1 tigre), sendo 11 amostras semelhantes a *E. chaffensis* e 10 semelhantes a *E. canis*, quando analisadas pelo BLAST. Também foram encontrados DNA de *Anaplasma* spp. em 4% das amostras (4 gatos do mato), sendo semelhante a *A. phagocytophilum* pelo BLAST. Até o presente, nenhum autor relacionou a presença desses agentes as alterações hematológicas de felídeos silvestres mantidos em cativeiro.

Esse trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de infecção natural por *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos no Distrito Federal e Goiás, Brasil, utilizando o método de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do DNA desses agentes em amostras de sangue total e as possíveis alterações hematológicas decorrentes destas infecções.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo teve autorização da Comissão de Ética para Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA- UnB) (UnB-DOC no 130988/2015) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) (SISBIO no 46097).

Amostras de sangue foram coletadas de 34 felídeos cativos, sem alterações clínicas aparentes, albergados no zoológico de Brasília, Distrito Federal (Zoo) e em um Centro Conservacionista de animais selvagens localizado no estado de Goiás (CC).

Os animais foram anestesiados utilizando-se dardos com anestésico tiletamina com zolazepam lançados por zarabatana na dose de 1,6 a 4,2mg/kg para grandes felinos, e até 11mg/kg para os pequenos felinos (Larsen et al., 2008). Foram coletados 5ml de sangue de cada animal utilizando-se seringas e agulhas descartáveis e acondicionados em tubos com EDTA, identificados e refrigerados para posterior análise laboratorial.

Para determinar o número de hemácias, leucócitos, plaquetas e a concentração de hemoglobina utilizou-se um contador hematológico veterinário semiautomático (Vet abc, HORIBA® Instruments Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). O volume globular (VG) foi determinado utilizando a técnica de micro-hematócrito. A contagem diferencial de leucócitos e a avaliação morfológica celular foram realizadas manualmente por meio da microscopia óptica a partir de esfregaços sanguíneos corados com panótico (Panótico NewProv®), Barueri, São Paulo, Brasil). Esse processo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UnB.

Armazenou-se uma parte de cada amostra de sangue a 4°C até à extração de DNA, que foi realizada utilizando kit comercial (Illustra Blood® genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare Technologies, Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20°C para posterior análise pela PCR. A extração de DNA e a PCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do Hospital Veterinário da UnB.

Todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R (Birkenheuer et al., 2003) para verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da PCR. A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para detecção do DNA de agentes da família Rickettsiaceae foram utilizados os oligonucleotídeos CS78 e CS323 (Labruna et al., 2004). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X já acrescido de MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM (Promega CorporationR, WI EUA), 10ng de DNA, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation®, WI EUA), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a PCR que detectou o DNA de *Ehrlichia canis* utilizou-se os oligonucleotídeos ECAN5 e HE3 (Murphy et al., 1998). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> a 2 mM (GE Health Care®, Little Chalfont, UK) , 10 ng de DNA, 0.2 mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol e 0.5 U de *Taq* DNA polimerase (GE Health Care®, Little Chalfont, UK), para um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 63°C por 2 minuto e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Na PCR para detecção do DNA de *Anaplasma platys* foram utilizados os oligonucleotídeos EHR16sr e Platys (Inokuma et al., 2000). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 3.2 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleotídeo

(Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol e 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para detecção do DNA de agentes de *Anaplasma phagocytophilum* utilizou-se os oligonucleotídeos MSP3F eMSP3R (Quadro 1) (Levin et al., 2002). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X já acrescido de MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM (Promega Corporation®, WI EUA), 10 ng de DNA, 0.2 mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol e 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation®, WI EUA), para um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (C1000 thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1.5% , corados com brometo de etídio (0.2mg/µL) e observados no transiluminador fluorescente (UV transilluminator®, UVP LLC, Upland, CA).

Em todas as PCRs foram utilizados como controles negativos água ultra pura miliQ (estéril e desprovida de DNA). Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. obtidas de animais naturalmente infectados.

Os dados foram analisados utilizando o programa computacional estatístico (SPSS versão 9.0, de 2008). Para teste de normalidade utilizou-se Shapiro-Wilk. Para as variáveis que seguiram distribuição normal foi realizado teste T e para as que não seguiam a distribuição normal foi realizado o teste Mann-Whitney U.

Considerou-se o intervalo de confiança de 95% para os dados hematológicos. Para análise de correlação entre os grupos e a origem ou sexo do animal, utilizou-se o Teste de Qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0.05$ .

Tabela 3.1 - Descrição dos oligonucleotídeos, sequências, genes e tamanho dos amplicons utilizados para detecção de agentes Rickettsiales

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene	Pares de base	Referência
GAPDH-R	CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T	GAPDH	400	(Birkenheuer et al., 2003)
GAPDH-F	CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC			
CS78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	gltA	401	(Labruna et al., 2004)
CS323	GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T			
ECAN5	CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A	rRNA16S	398	(Murphy et al., 1998)
HE3	TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TA			
EHR16sr	GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC	rRNA16S	678	(Inokuma et al., 2000)
Platys	GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG			
MSP3F	TGG TGG TGC GGG ATA TTT CTA TGT GCCC	P44	179	(Levin et al. 2002)
MSP3R	ATT CCG AGG ATC AGG TGT G			



### 3. RESULTADOS

Foram utilizadas para o experimento amostras de sangue de 34 felídeos cativos provenientes do ZOO (n=21) e do CC (n=13). Esses animais eram de 9 espécies diferentes: 1 gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*), 1 gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), 3 gatos-palheiro (*Leopardus pajeros*), 2 jaguarundis (*Felis yagouaroundi*), 2 jaguatiricas (*Felis pardalis*), 2 leões (*Panthera leo*), 11 onças (*Panthera onca*), 7 suçuaranas (*Puma concolor*) e 5 tigres-de-bengala (*Panthera tigris tigris*). Dos animais utilizados, 15 eram fêmeas e 19 eram machos.

As trinta e quatro amostras testadas foram positivas na PCR para o gene GAPDH, apresentando um produto de 400pb, denotando a qualidade do DNA utilizado e a ausência de inibidores da PCR (Fig.3.1A).

Nenhuma das amostras foi positiva para a família Rickettsiaceae (Fig.3.1B). Vinte e duas amostras (64,7%) foram positivas na PCR para *Anaplasma platys*, onde foram observados produtos nos tamanhos de 678pb (Fig.3.1C). Dentre essas amostras positivas, dois (5,88%) animais também foram positivos na PCR para *E. canis* (Fig.3.1D) e dois (5,88%) animais também foram positivos para *A. phagocytophilum* (Fig.3.1E), sendo consideradas coinfeções (Tabela 2). Pode-se constatar uma elevada taxa de infecção por *A. platys* nos animais amostrados em relação aos demais agentes estudados.

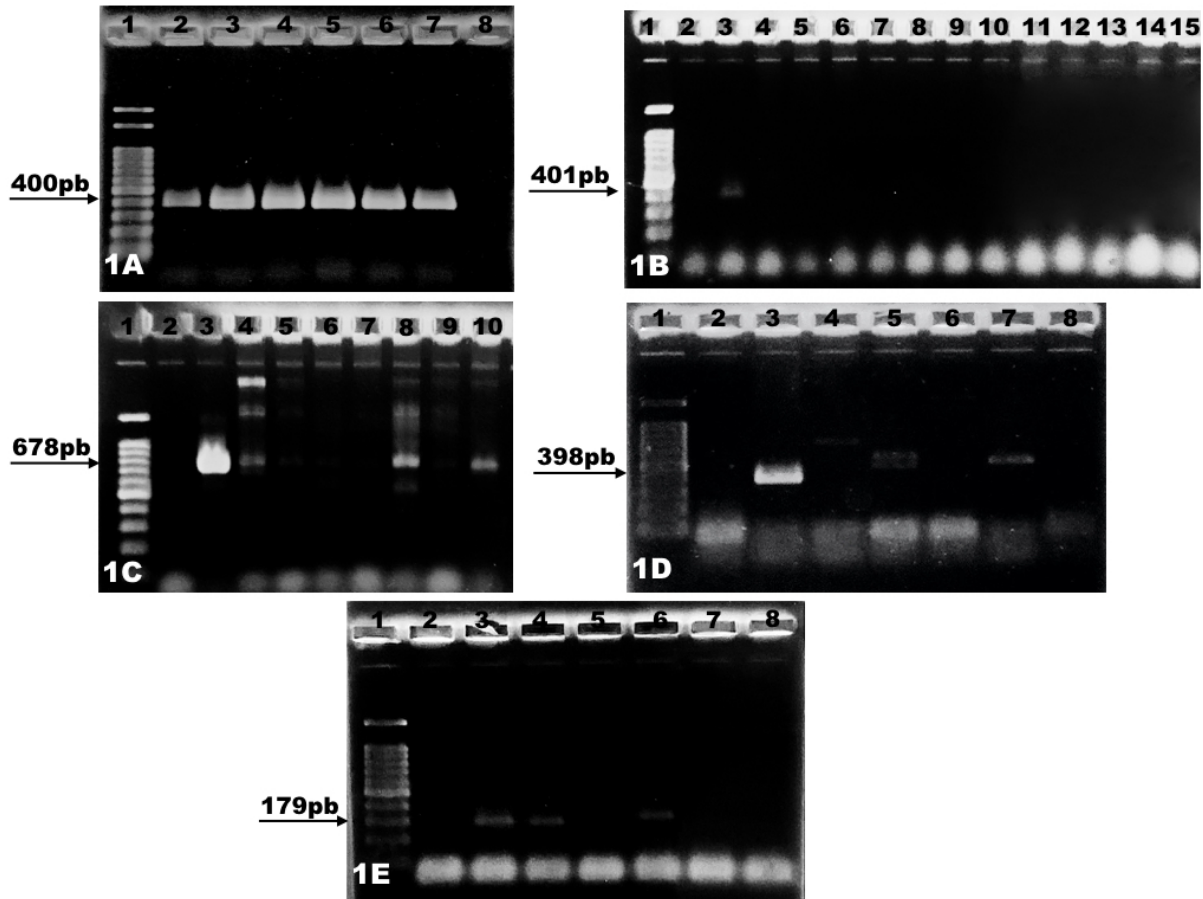


Figura 3.1. Eletroforese dos produtos da PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos, em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) para a detecção de DNA de agentes Rickettsiales em sangue de felídeos silvestres. A. Amplificação do gene GAPDH (GAPDH-F e GAPDH-R), sendo (1) Lader, (2) controle positivo, (3-7) animais positivos, (8) controle negativo (água). B. Detecção de DNA da família Rickettsiaceae (CS78 e CS323), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-15) animais negativos. C. Detecção de DNA de *Anaplasma platys* (EHR16sr e Platys), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (4-10) animais positivos, (11-15) animais negativos. D. Detecção de DNA de *Ehrlichia canis* (HE3 e EHR16sr), sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (5 e 7) animais positivos, (4, 6 e 8) animais negativos. E. Detecção de DNA de *Anaplasma phagocytophilum* MSP3-R e MSP3-F, sendo (1) Lader, (2) controle negativo (água), (3) controle positivo, (5 e 7) animais positivos, (4, 6 e 8) animais negativos.

Tabela 3.2 - Resultados obtidos nas PCR de amostras de sangue de felídeos silvestres provenientes do zoológico (ZOO) e de um centro conservacionista de animais selvagens (CC).

Identificação	Espécie	Local	Sexo	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Rickettsia</i> spp.
GJ	Gato Maracajá	ZOO	M	+	+	-	-
GM	Gato do Mato	ZOO	M	-	+	-	-
GP01	Gato Palheiro	NEX	M	-	+	-	-
GP02	Gato Palheiro	ZOO	M	-	+	-	-
GP03	Gato Palheiro	ZOO	M	-	+	-	-
JD01	Jaguarundi	ZOO	F	-	-	-	-
JD02	Jaguarundi	ZOO	M	-	+	-	-
JG02	Jaguarundi	CC	M	-	+	-	-
L01	Leão	ZOO	M	-	+	-	-
L02	Leão	ZOO	M	-	+	-	-
OP01	Onça Pintada	ZOO	F	-	+	-	-
OP02	Onça Pintada	ZOO	F	-	+	-	-
OP03	Onça Pintada	CC	M	-	-	-	-
OP04	Onça Pintada	CC	M	-	-	-	-
OP05	Onça Pintada	CC	M	-	+	-	-
OP06	Onça Pintada	CC	F	-	+	-	-
OP07	Onça Pintada	ZOO	M	-	-	-	-
OP08	Onça Pintada	CC	F	-	+	-	-
OP09	Onça Pintada	CC	F	-	+	-	-
OP10	Onça Pintada	ZOO	F	-	+	-	-
SC01	Suçuarana	ZOO	F	-	-	-	-
SC02	Suçuarana	ZOO	F	-	-	-	-
SC03	Suçuarana	ZOO	F	-	-	-	-
SC04	Suçuarana	CC	M	-	-	-	-
SC05	Suçuarana	CC	M	-	+	-	-
SC06	Suçuarana	CC	F	-	-	-	-
SC07	Suçuarana	CC	M	+	+	-	-
TB01	Tigre de Bengala	ZOO	F	-	-	-	-
TB02	Tigre de Bengala	ZOO	F	-	+	-	-
TB03	Tigre de Bengala	ZOO	F	-	+	-	-
TB04	Tigre de Bengala	ZOO	M	-	-	-	-
TB05	Tigre de Bengala	ZOO	M	-	-	-	-
JG01	Jaguarundi	ZOO	F	-	+	+	-
OP11	Onça Pintada	CC	M	-	+	+	-

Hemograma foi feito em apenas 24 amostras coletadas. A análise obteve médias, desvio padrão, limites inferiores e superiores com intervalo de confiança de 95%. Na comparação dos valores entre os grupos, não houve diferença ( $p > 0.05$ ) entre os animais positivos e os animais negativos (Tabela 3). Contudo, merece destaque a análise individual dos hemogramas de dois animais, ambos positivos nas PCRs realizadas. O primeiro hemograma era de um gato maracajá, positivo para *E. canis* e *A. platys*, cujo eritrograma apresentava uma severa anemia (VG = 13%, hemácias =  $2,44 \times 10^6$ , hemoglobina = 4,3g/dL). E o segundo hemograma de um gato palheiro, positivo para *A. platys* que apresentou trombocitopenia (plaquetas = 110.000/ $\mu$ L). Na avaliação do esfregaço sanguíneo deste animal foi observada inclusão característica de mórula de *A. platys* em uma plaqueta. Todos os demais animais, positivos ou negativos apresentaram hemogramas dentro dos valores de referência para as espécies estudadas.

Utilizando o Teste do Qui-quadrado ao nível de significância de 5%, não houve diferença significativa no número de animais positivos provenientes do ZOO e do CC, bem como também não houve diferença entre os sexos.

Tabela 3.3 - Média, desvio padrão (dp) e limites inferiores e superiores (intervalo de confiança: IC: 95%) dos parâmetros hematológicos de felídeos silvestres cativos de DF e GO. Os animais foram divididos em grupo de positivos e negativos para agentes Rickettsiales, pela análise de PCR sérica. Não houve diferença significativa entre grupos para os valores das médias e de limites inferiores e superiores dos parâmetros hematológicos, considerando  $p \leq 0,05$ , pelo teste T e Mann-Whitney U.

Parâmetros hematológicos	Positivos (n=10)	Negativos (n=14)		
	Média e dp	IC (95%)	Média e dp	IC (95%)
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /mL)	6,25 ± 2,14	5,87 a 6,64	5,87 ± 2,56	5,41 a 6,34
Volume Globular (%)	33,29 ± 8,87	31,69 a 34,88	37,20 ± 8,20	35,72 a 38,68
Plaquetas	318.000 ± 130	294.000 a 341.000	241.000 ± 86,69	226.000 a 257.000
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /mL)	10.435 ± 3.991	9.716 a 11.155	10.420 ± 4.585	9,593 a 11.246
Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /mL)	8.338 ± 4.376	7.549 a 9.127	7.833 ± 4.241	7.068 a 8.597
Linfócitos	2.028 ± 739	1.894 a 2.161	1.887 ± 1.245	1.662 a 2.111
Eosinófilos	190 ± 178	158 a 222	271 ± 223	231 a 311
Monócitos	203 ± 142	178 a 229	312 ± 246	267 a 356

## 5. DISCUSSÃO

As doenças infecciosas transmitidas por vetores artrópodes são reemergentes em todo o mundo, devido às mudanças climáticas e ao acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais, constituindo um grande desafio na medicina humana e veterinária. A proximidade entre os animais selvagens cativos, domésticos e humanos auxilia na transmissão de parasitas e amplia os potenciais reservatórios. Algumas espécies de Rickettsiales têm grande importância como causadores de doenças, tais como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* (Allison and Little, 2013), *Rickettsia rickettsii* (Labruna, 2009; Fortes et al., 2011; Oliveira et al., 2017), *R. parkerii*, *R. felis*, *R. typhi* (Fortes et al., 2011) e *A. phagocytophilum* (Vieira et al., 2011). Entretanto, ainda não está estabelecido quais desses agentes ocorrem em felídeos silvestres, tampouco quais alterações hematológicas causariam nesses animais.

Em nenhuma das amostras de sangue obtidas foi amplificado DNA de *Rickettsia* spp. por meio da PCR. Os felídeos desse estudo vivem na região do cerrado brasileiro, ambiente com grande população de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e gambás (*Didelphys* sp.), que são hospedeiros amplificadores de riquetsias, assim como transportadores de carrapatos potencialmente infectados, principalmente *Amblyomma* spp. Sabe-se, entretanto, que esse carrapato é encontrado principalmente no Sudeste do país, onde se concentra também a maioria de casos de Febre Maculosa Humana (Nieri-Bastos et al., 2014).

Nos últimos 16 anos, apenas 8 casos da doença foram diagnosticados em GO e 3 casos no DF, enquanto que no estado de São Paulo foram diagnosticados 813 casos (Brasil, 2017). Outro aspecto a ser considerado é o desconhecimento acerca da patogenicidade de *Rickettsias* spp. para os felídeos silvestres ou se esses animais desenvolvem imunidade e são capazes de eliminá-las de seus organismos. Segundo Soares et al. (2015) esses agentes normalmente causam infecções transitórias em vertebrados, que duram apenas alguns dias, depois tornam-se imunorresistentes e não seria mais possível encontrar o DNA da *Rickettsia* no sangue do hospedeiro. O mesmo é passível de ocorrer nos felídeos silvestres. No presente

estudo não foram realizados testes sorológicos para identificação de anticorpos para os agentes pesquisados, o que poderia ter auxiliado na avaliação da ocorrência ou não da infecção prévia com esses agentes na região. Widmer et al. (2011) encontraram anticorpos, mas não DNA, de espécies de *Rickettsias* em amostras de sangue de onças de vida livre do Pantanal. Em estudo com gatos domésticos, também foram encontradas amostras de sangue contendo anticorpos, mas nenhum DNA de *Rickettsia* foi identificado (Bayliss et al., 2009). Entretanto, Segura et al. (2014) encontraram soropositividade em 27,8% dos gatos estudados na Espanha e 10,8% amostras positivas na PCR. Não se sabe, entretanto, se esses gatos estavam na fase aguda da infecção. A espécie de *Rickettsia* presente também pode influenciar no ciclo do agente no organismo dos hospedeiros, facilitando ou não a detecção de seu DNA em sangue periférico.

A presença de DNA de *A. platys* foi encontrada na maioria das amostras analisadas (64,7%). *A. platys* é um microrganismo que infecta plaquetas, resultando em inclusões basofílicas denominadas mórulas, que causa a doença denominada trombocitopenia cíclica canina (Allison and Little, 2013). Correa et al. (2011) investigaram a presença do DNA de *A. platys* em amostras de sangue de gatos domésticos em Campos do Goytacazes/RJ, sendo detectada em 13,18% das amostras, sugerindo que gatos possam servir como potenciais reservatórios para esses agentes. Acredita-se que o mesmo possa ocorrer com os felídeos silvestres cativos que, talvez pelo convívio próximo com animais domésticos em algumas regiões, também se infectem com esses agentes tornando-se reservatórios.

A ocorrência de DNA de *E. canis* foi demonstrada em 5,88% das amostras analisadas, resultado inferior ao encontrado por André et al. (2010), que obtiveram 15% das amostras de felídeos silvestres cativos positivas. Em contrapartida, Widmer et al. (2011) realizaram um estudo com onças de vida livre do Pantanal e não encontraram nenhum animal positivo. Os animais positivos no presente estudo foram uma suçuarana e um gato-maracajá.

O DNA de *A. phagocytophilum* foi encontrado em 5,88% das amostras analisadas, resultado semelhante ao encontrado felídeos silvestres do zoológico de Sorocaba/SP, que foi de 4% em gatos-do-mato (André et al., 2012). A presença de DNA de *A. phagocytophilum* também foi relatada em oito pumas nos EUA (Foley et al., 1999). *A. phagocytophilum* é o agente causal da zoonose ehrlichiose granulocítica humana (Vieira et al.,

2011). No presente estudo, os animais positivos para *A. phagocytophilum* foram negativos para *E. canis*, entretanto havia coinfeção com *A. platys*.

Os dados hematológicos dos felídeos silvestres positivos para agentes Rickettsiales do presente estudo não foram significativamente diferentes dos dados encontrados no grupo de animais negativos, mesmo quando houve coinfeção. A análise individual dos hemogramas realizados revelou que um animal co-infectado com *E. canis* e *A. platys* apresentou anemia e outro infectado com *A. platys* apresentou trombocitopenia, entretanto, como não foram realizados outros exames clínico-laboratoriais para averiguar a existência de outras afecções concomitantes, não foi possível inferir que estas alterações tenham sido decorrentes da infecção por estes agentes. Ainda é incerto se *A. platys* seja capaz de causar doença clínica em felídeos silvestres e quais as alterações hematológicas decorrentes desta infecção. Em gatos domésticos alterações como anemia e trombocitopenia foram relatadas, porém, os animais apresentavam outras doenças concomitantes (Hegarty et al., 2015). *E. canis* é o agente etiológico da erliquiose canina no Brasil, doença que se apresenta desde uma infecção inaparente até casos que levam ao óbito. A bactéria infecta leucócitos mononucleares, podendo causar alterações hematológicas como trombocitopenia, pancitopenia e linfocitose. Em gatos domésticos, já foi documentada a infecção natural e experimental por *Ehrlichia* spp. (Almosny, 1998; Little, 2010; Ebani and Bertelloni, 2014; Maia et al., 2014) e assume-se que as alterações clínicas e laboratoriais nessa espécie sejam semelhantes às que ocorrem em cães (Almosny et al., 1998; Little, 2010; Braga et al., 2014). Braga et al. (2013) encontraram anemia, trombocitopenia e linfopenia nos gatos positivos na PCR para *E. canis*. Em felídeos silvestres, é incerto se essas bactérias causam alterações hematológicas. *A. phagocytophilum* já foi documentado em gatos domésticos causando anemia e trombocitopenia em animais doentes (Adaszek et al., 2015), entretanto, nenhum estudo havia sido realizado em silvestres.



## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho identificou a ocorrência da infecção por *Anaplasma Platys*, *Ehrlichia canis* e *A. phagocytophilum* em felídeos selvagens, o que sugere que estes animais podem servir como potenciais reservatórios destes agentes para humanos e outros animais.

Estudos futuros, com um número maior de animais, principalmente de vida livre, devem ser realizados no intuito de avaliar se estes microrganismos são capazes de ocasionar alterações clínicas e hematológicas nos felinos selvagens.

**Agradecimentos.-** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro. À Fundação Zoológico de Brasília e ao Centro Conservacionista por disponibilizarem os animais e o pessoal para a obtenção das amostras de sangue.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASZEK, Ł. et al. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 4, p. 333-337, 2015.

ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Vet Clin Pathol**, v. 42, n. 2, p. 127-44, Jun 2013. ISSN 1939-165X (Electronic) 0275-6382 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647393> >.

ALMEIDA, A. P. et al. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks Tick-Borne Diseases**, v. 2, p. 209-212, 2011.

ALMOSNY, N. R. P. Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 224 (Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALMOSNY, N. R. P. et al. Ehrlichiose clínica em gatos (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998. ISSN 1413-0130 1984-7130.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and Serologic Detection of Ehrlichia spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

ANDRE, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 3, n. 4, p. 247-53, Sep 2012. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749737> >.

BAYLISS, D. B. et al. Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 4, p. 266-70, Apr 2009. ISSN 1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786845> >.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4172-7, Sep 2003. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958243> >.

BRAGA, I. S. A. et al. Detection of Ehrlichia canis in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 641-645, 2014.

BRASIL. Casos Febre Maculosa 2000 a 2017. **Ministério da Saúde**, 2017.

COIMBRA, H. S. et al. Ehrlichiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 97-101, 2006.

CORREA, E. S. et al. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

DUMLER, J. S. et al. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis**, v. 45 Suppl 1, p. S45-51, Jul 15 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582569> >.

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F. Serological evidence of exposure to Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum in Central Italian healthy domestic cats. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 5, p. 668-671, 2014.

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

FOLEY, J. E. et al. Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 703-709, 1999.

FORTES, F. S. et al. Anti-Rickettsia spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 11, p. 1014-1018, 2011.

FOURNIER, P.-E.; RAOULT, D. Rickettsia and human rickettsioses - Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**. 1: CRC Press, 2007. chap. 1, p.5-13. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9780849376115.

HEGARTY, B. C. et al. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 320, Jun 12 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062723> >.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in Brown Dog Ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1166, p. 156-66, May 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538276> >.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 90-8, Jan 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715737> >.

LARSEN, R. S.; KREEGER, T. J.; WEST, G. Canids. In: LARSEN, R. S.; HEARD, D., *et al* (Ed.). **Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia**. New Jersey: Blackwell Publishing, 2008. p.395-407.

LEVIN, M. L. et al. Comparison of the Reservoir Competence of Medium-Sized Mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 3, p. 125-136, 2002.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 1121-1140, 2010.

MAIA, C. et al. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

MURPHY, G. L. et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 325-339, 1998.

NIERI-BASTOS, F. S. K. F. A. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 7, p. 1-7, 2014.

OLIVEIRA, C. S. et al. Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 52-57, 2017. ISSN 0100-736X.

PAROLA, P. et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 657-702, 2013.

PICOLOTO, G. et al. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 186-188, 2010.

SACCHI, A. B. et al. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comp Immunol Microbiol**

**Infect Dis**, v. 35, n. 4, p. 325-34, Jul 2012. ISSN 1878-1667 (Electronic) 0147-9571 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381686> >.

SEGURA, F. et al. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 353, 2014.

SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Exp Appl Acarol**, v. 65, n. 1, p. 125-40, Jan 2015. ISSN 1572-9702 (Electronic) 0168-8162 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273064> >.

VIEIRA, R. F. D. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011. ISSN 0103-846X.

WIDMER, C. E. et al. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 8, p. 1001-5, Aug 2011. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612532> >.

## CONCLUSÕES

O presente estudo detectou que há ocorrência de agentes rickettsiales na região no Distrito Federal e Goiás, uma vez que foram amplificados DNA de *A. platys*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de felídeos silvestres dessa região.

Em gatos domésticos, no entanto, não foram amplificados DNA de agentes rickettsiales nem mesmo nos indivíduos parasitados por pulgas - vetores de *R. felis* e *R. typhi* - e com soropositividade para retrovírus (causadores de imunossupressão). Esses dados indicam que provavelmente esses gatos não estivessem infectados. A sorologia seria interessante para averiguar se realmente não havia infecção, ou se havia infecção porém com baixa bacteremia.

Não houve diferença significativa entre os dados hematológicos dos felídeos silvestres positivos com os negativos para agentes rickettsiales, entretanto, essas análises foram feitas em um número pequeno de indivíduos e de espécies distintas. Estudos futuros com um maior número de animais de cada espécie permitirá análises mais robustas desses achados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASZEK, Ł. et al. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 4, p. 333-337, 2015.

ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Vet Clin Pathol**, v. 42, n. 2, p. 127-44, Jun 2013. ISSN 1939-165X (Electronic) 0275-6382 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647393> >.

ALMEIDA, A. P. et al. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks Tick-Borne Diseases**, v. 2, p. 209-212, 2011.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 224 (Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALMOSNY, N. R. P. et al. Ehrlichiose clínica em gatos (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998a. ISSN 1413-0130 1984-7130.

ALMOSNY, N. R. P. et al. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. LF Livros, 2002.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

ANDRE, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 3, n. 4, p. 247-53, Sep 2012. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749737> >.

BAYLISS, D. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and *Rickettsia* species DNA in the blood of cats with and without fever. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 4, p. 266-70, Apr 2009. ISSN

1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786845> >.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003. ISSN 0095-1137.

BLANTON, L. S.; QUADE, B. R.; BOUYER, D. H. Differentiation of *Rickettsia felis* and *Rickettsia felis*-Like Organisms via Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 19, n. 8, p. 637-639, Aug 2019. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31021302> >.

BLANTON, L. S.; WALKER, D. H. Flea-Borne Rickettsioses and Rickettsiae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 1, p. 53-56, 2017.

BRAGA, I. S. A. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 641-645, 2014.

BRAGA, M. D. S. C. D. O. et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 37-41, 2012.

BRASIL. Pesquisa nacional de saúde : 2013 : acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências : Brasil, grandes regiões e unidades da federação /. IBGE. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: 100 p. 2015.

\_\_\_\_\_. Febre Maculosa Brasileira e outras rickettsioses. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde: 379-386 p. 2016.

\_\_\_\_\_. Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019\*. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde 2020a.

\_\_\_\_\_. Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017. SAÚDE, S. D. V. E. **Ministério da Saúde**, 2017.



\_\_\_\_\_. Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2019\*. SAÚDE, S. D. V. E.: Minsitério da Saúde 2020b.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular Evidence Supporting Ehrlichia canis–Like Infection in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 642-649, 2002a.

BRITES-NETO, J. et al. Diferenciação morfométrica entre larvas de Amblyomma sculptum Berlese, 1888 e Amblyomma dubitatum Neumann, 1899. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1521-1528, 2018.

BROUQUI, P.; MATSUMOTO, K. ANAPLASMATACEAE AND HUMAN ANAPLASMOSIS AND EHRLICHIOSES - Bacteriology and Phylogeny of Anaplasmataceae. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**: CRC Press, 2007. chap. 13, p.179-198. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9781420019971.

BROWN, L. D.; MACALUSO, K. R. Rickettsia felis, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Curr Trop Med Rep**, v. 3, p. 27-39, 2016. ISSN 2196-3045 (Print). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340613> >.

COELHO, M. G. et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever Rickettsia and Rickettsia bellii in Minas Gerais, Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, n. 3, p. 275-82, Mar 31 2016. ISSN 1972-2680 (Electronic) 1972-2680 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27031460> >.

COSTA, F. V. A. D. et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1531-1536, 2017. ISSN 1678-5150 0100-736X.

CORREA, E. S. et al. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos - alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Cães, gatos, parasitos e humanos no Brasil: abrindo a caixa preta. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 22, 2014a.

\_\_\_\_\_. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014b.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v. 4, 2011.

DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016. ISSN 1678-9199 (Print) 1678-9180 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555867> >.

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

DUMLER, J. S. et al. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis**, v. 45 Suppl 1, p. S45-51, Jul 15 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582569> >.

DUTRA, F. et al. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnosis Investiagtion**, v. 13, p. 433-437, 2001.

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F. Serological evidence of exposure to Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum in Central Italian healthy domestic cats. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 5, p. 668-671, 2014.

ETTEMA, T. J. G.; ANDERSSON, S. G. E. The a-proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Biology Letters**, v. 5, p. 429-432, 2009.

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

FILONI, C. et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 1, p. 166-73, Jan 2012. ISSN 1943-4936 (Electronic) 1040-6387 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908268> >.

FOLEY, J. E. et al. Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 703-709, 1999.

FORTES, F. S. et al. Anti-Rickettsia spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 11, p. 1014-1018, 2011.

FOURNIER, P.-E.; RAOULT, D. RICKETTSIA AND HUMAN RICKETTSIOSSES - Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D. e PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial Diseases**. 1: CRC Press, 2007. chap. 1, p.5-13. (Infectious Disease and Therapy). ISBN 9780849376115.

FREITAS, G. C.; CARREGAROLI, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GALEMORE, E. R.; LABATO, M. A.; O'NEIL, E. Prevalence of Anaplasma phagocytophilum infection in feral cats in Massachusetts. **JFMS Open Rep**, v. 4, n. 1, p. 2055116917753804, Jan-Jun 2018. ISSN 2055-1169 (Electronic) 2055-1169 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29399369> >.

GORNA, M. et al. Detection of Anaplasma phagocytophilum in a cat. **Veterinarni Medicina**, v. 1, p. 39-43, 2013.

GUIMARAES, A. et al. Molecular detection, characterization of Anaplasma spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state. **Acta Trop**, v. 191, p. 239-242, Mar 2019. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30615856> >.

GUIMARAES, A. et al. Ehrlichia spp. infection in domestic cats from Rio de Janeiro State, southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 28, n. 1, p. 180-185, Jan-Mar 2019. ISSN 1984-2961 (Electronic) 0103-846X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30892460> >.

HARVEY, T. V. et al. Babesia spp. and Ehrlichia chaffeensis infection in Dogs from Southeastern Bahia, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, 2017.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684-710, Oct 31 2012. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202500> >.

HEGARTY, B. C. et al. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 320, Jun 12 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062723> >.

HORTA, M. C. et al. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1166, p. 156-66, May 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538276> >.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004. ISSN 0095-1137.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 2, p. 249-55, Summer 2007. ISSN 1530-3667 (Print) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627445> >.

LABRUNA, M. B. et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 3, p. 869-73, Feb 2007. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142361> >.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LAPPIN, M. R. Update on flea and tick associated diseases of cats. **Vet Parasitol**, v. 254, p. 26-29, Apr 30 2018. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29657007> >.

LAPPIN, M. R.; TASKER, S.; ROURA, X. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats. 1. Flea-associated diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, p. 31-39, 2020.

LARSEN, R. S.; KREEGER, T. J.; WEST, G. Canids. In: LARSEN, R. S.; HEARD, D., *et al* (Ed.). **Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia**. New Jersey: Blackwell Publishing, 2008. p.395-407.

LEVIN, M. L. *et al*. Comparison of the Reservoir Competence of Medium-Sized Mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 3, p. 125-136, 2002.

LIMA, M. L. F. *et al*. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381-385, 2010.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 1121-1140, 2010.

MACIEIRA, D. B. *et al*. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro--Brazil. **J Feline Med Surg**, v. 10, n. 2, p. 120-9, Apr 2008. ISSN 1098-612X (Print) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905624> >.

MACHADO, R. Z. *et al*. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.

MAGGI, R. G.; KRAMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 145, Mar 28 2019. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30917860> >.

MAIA, C. *et al*. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

MAZZOTTI, G. A. et al. Investigação molecular de Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Anaplasma phagocytophilum e Rickettsia spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 528-535, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

MELO JUNIOR, O. A. et al. OCORRÊNCIA DE Anaplasma bovis (Donatien & Lestoquard, 1936, Dumler et al. 2001) NA REGIÃO DE BOM JESUS DO ITABAPOANA, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, 2010. ISSN 1809-6891 1518-2797.

MENDES, J. C. R. et al. Serosurvey of Rickettsia spp. in cats from a Brazilian spotted fever-endemic area. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 28, n. 4, p. 713-721, Oct-Dec 2019. ISSN 1984-2961 (Electronic) 0103-846X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31721931> >.

MURPHY, G. L. et al. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 325-339, 1998.

NIERI-BASTOS, F. S. K. F. A. et al. Rickettsial infection in Amblyomma cajennense ticks and capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 7, p. 1-7, 2014.

NOGUERAS, M. M. et al. Molecular detection of Rickettsia typhi in cats and fleas. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71386, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940746> >.

OGDEN, N. H. et al. A review of studies on the transmission of Anaplasma phagocytophilum from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 195-202, 2002.

OLIVEIRA, A. C. et al. Molecular detection of Anaplasma bovis, Ehrlichia canis and Hepatozoon felis in cats from Luanda, Angola. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 167, Mar 20 2018. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554946> >.

OLIVEIRA, L. S. et al. First report of Ehrlichia ewingii detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 55-56, 2009.

OLIVEIRA, L. S. D. et al. Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 53-54, 2008.

OLIVEIRA, C. S. et al. Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 52-57, 2017. ISSN 0100-736X.

PAROLA, P. et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 657-702, 2013.

PENNISI, M. G. et al. Anaplasma, Ehrlichia and Rickettsia species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **J Feline Med Surg**, v. 19, n. 5, p. 542-548, May 2017. ISSN 1532-2750 (Electronic) 1098-612X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438088> >.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. Ehrlichia canis-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

PICOLOTO, G. et al. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 186-188, 2010.

PINTO, A. B. T. et al. Anaplasmataceae em gatos (*Felis catus*) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1137-1150, 2018. ISSN 1678-5150 0100-736X.

PORTILLO, A. et al. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 17, n. 1, p. 23-32, Jan 2017. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055574> >.

QUROLLO, B. Feline Vector-Borne Diseases in North America. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 49, n. 4, p. 687-702, Jul 2019. ISSN 1878-1306 (Electronic) 0195-5616 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30961995> >.

RYMASZEWSKA, A.; GREINDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 11, p. 573-584, 2008.

RYSER-DEGIORGIS, M. P. et al. Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. **J Wildl Dis**, v. 41, n. 1, p. 58-66, Jan 2005.

ISSN 0090-3558 (Print) 0090-3558 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827211> >.

SACCHI, A. B. et al. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 4, p. 325-34, Jul 2012. ISSN 1878-1667 (Electronic) 0147-9571 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381686> >.

SANTARÉM, V. A.; LAPOSY, C. B.; FARIAS, M. R. D. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005. ISSN 18098215.

SEGURA, F. et al. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 353, 2014a.

SILVA, F. S. et al. Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasi. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 1-6, 2014.

SILVA, L. J.; PAPAORDANOU, P. M. O. Murine (endemic) typhus in Brazil: case report and review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 283-285, 2004.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 958-962, 2017. ISSN 1678-5150 0100-736X.

SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Exp Appl Acarol**, v. 65, n. 1, p. 125-40, Jan 2015. ISSN 1572-9702 (Electronic) 0168-8162 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273064> >.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

TATENO, M. et al. Molecular epidemiologic survey of *Bartonella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. **J Wildl Dis**, v. 49, n. 3, p. 646-52, Jul 2013. ISSN 1943-3700 (Electronic) 0090-3558 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778615> >.

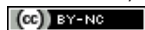


VIEIRA, R. F. D. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011. ISSN 0103-846X.

VILHENA, H. et al. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 6, 2013.

WIDMER, C. E. et al. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 8, p. 1001-5, Aug 2011. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612532> >.

ZERINGOTA, V. et al. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 8, n. 1, p. 81-89, Jan 2017. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27745888> >.



## Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos<sup>1</sup>

Giovana A. Mazzotti<sup>2</sup>, Wanessa A.C. Silva<sup>2</sup>, Filipe T. Carneiro<sup>2</sup>, Marcela C. Scalon<sup>2</sup>, Mariana A. Lima<sup>2</sup>, Marianne A. Teixeira<sup>2</sup>, Alice C.F. Lima<sup>2</sup> e Giane R. Paludo<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- Mazzotti G.A., Silva W.A.C., Carneiro F.T., Scalon M.C., Lima M.A., Teixeira M.A., Lima A.C.F. & Paludo G.R. 2018. [Molecular investigation of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in captive wild felids.] Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(3):528-535. Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, SGAN 605, Avenida L2, Brasília, DF 70910-900, Brazil. E-mail: [giane@unb.br](mailto:giane@unb.br)

Vector-borne diseases have been emerging and reemerging all over the world, causing a challenge to veterinary and human medicine. Among these diseases are those caused by agents of the order Rickettsiales, obligatory intracellular Gram-negative bacteria, with ability to infect several animals and humans. Rickettsiales of the species *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. residing in cytoplasmic vacuoles of leukocytes and platelets. Rickettsiales of the species *Rickettsia* spp. freely infect cytoplasm or nucleus of host cells. The aim of the present study was to investigate the natural infection with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in captive wild felids at the Federal District and Goiás, Brazil. In addition, it was also aimed to relate possible changes in hemogram with the presence of these agents. Blood samples from 34 animals were analyzed by PCR to detect the presence of DNA from these agents. The DNA of *Ehrlichia canis* was detected in 5.8% (2/34) of samples. *A. platys* was detected in 64.7% (22/34), *A. phagocytophilum* was detected in 5.8% (2/34). The DNA of *Rickettsia* spp. was not detected in any sample. Two felids presented co-infection with *E. canis* and *A. platys*, and two presented co-infection with *A. platys* and *A. phagocytophilum*. There were no significant differences in hematological data from positive and negative samples. The data suggest that captive wild felids can serve as potential reservoirs for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp., despite hematological abnormalities were not observed.

**INDEX TERMS:** Molecular investigation, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, captivity, wild felids, *Anaplasma* spp., diagnose, polymerase chain reaction, cats, parasitoses.

**RESUMO.**- Doenças transmitidas por vetores estão emergindo e reemergindo em todo o mundo, representando um desafio na medicina humana e veterinária. Entre essas doenças estão aquelas causadas pelos agentes da ordem das Rickettsiales, que são bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias, com capacidade de infectar vários animais e seres humanos.

As Rickettsiales das espécies *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. são observadas em vacúolos citoplasmáticos de leucócitos e plaquetas. As Rickettsiales da espécie *Rickettsia* spp. infectam livremente citoplasma ou núcleo de células hospedeiras. O objetivo do presente estudo foi investigar a infecção natural por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos no Distrito Federal e Goiás, Brasil. Além disso, também objetivou-se relacionar possíveis alterações hematológicas decorrentes da presença desses agentes. Amostras de sangue de 34 animais foram analisadas por meio da PCR para detecção de presença de DNA desses agentes. O DNA de *Ehrlichia canis* foi detectado

<sup>1</sup> Recebido em 5 de julho de 2017.

Aceito para publicação em 16 de agosto de 2017.

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), SGAN 605, Avenida L2, Brasília, DF 70910-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [giane@unb.br](mailto:giane@unb.br)

em 5,8% (2/34) das amostras, *A. platys* foi detectado 64,7% (22/34), *A. phagocytophilum* foi detectado em 5,8% (2/34). O DNA de *Rickettsia* spp. não foi detectado em nenhuma amostra. Dois felídeos apresentaram coinfeção por *E. canis* e *A. platys* e dois apresentaram coinfeção por *A. platys* e *A. phagocytophilum*. Não houve diferenças significativas nos dados hematológicos das amostras positivas e negativas. Os dados sugerem que os felídeos selvagens cativos podem servir como potenciais reservatórios para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., a despeito de não ocasionarem alterações hematológicas.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Investigação molecular, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., felídeos selvagens, cativeiro, *Anaplasma* spp., diagnóstico, PCR, felinos, parasitoses.

## INTRODUÇÃO

A ordem Rickettsiales, composta pelas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, compreende bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias, muito pequenas (0,3 a 2,0µm), pleomórficas, sem motilidade (Dumler et al. 2001, Fournier & Raoult 2007). Algumas dessas bactérias podem causar danos à saúde tanto dos animais quanto de seres humanos infectados (Vieira et al. 2011). As bactérias *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica são consideradas importantes zoonoses (Soares et al. 2015, Oliveira et al. 2017), bem como o *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* e *E. ewingii* (Vieira et al. 2011).

Já foi relatada a ocorrência de nove agentes da família Rickettsiaceae no Brasil. As espécies que têm como vetores os carrapatos pertencem aos grupos Febre Maculosa (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *candidatus "R. amblyommii"*) e *bellii* (*R. bellii*). As espécies transmitidas por pulgas pertencem ao grupo de transição (*R. felis*); Grupo do tifo (*R. typhi*) e Grupo Canadensis (*R. monteiroi*) (Almeida et al. 2011, Labruna et al. 2011). As cepas de *rickettsias* já descritas foram Mata Atlântica (ou Bahia), ApPR, COOPERI, NOD, Aranha e Pampulha (Parola et al. 2013). A família Anaplasmataceae compreende os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Neorickettsia* (Dumler et al. 2001). No Brasil, já foram encontradas as espécies *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* (Sacchi et al. 2012), *A. marginale* (Picoloto et al. 2010), *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, todas tendo como vetor o carrapato (Vieira et al. 2011). A espécie *N. risticii*, descrita infectando equinos no Rio Grande do Sul, tem como vetores trematódeos aquáticos (Coimbra et al. 2006).

Poucos trabalhos descreveram a ocorrência desses agentes em felídeos silvestres no país (Filoni et al. 2006, André et al. 2010, 2012, Widmer et al. 2011). No Brasil, Filoni et al. (2006) realizaram o primeiro trabalho buscando a presença de anticorpos para *E. canis* e *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de 21 felídeos silvestres (18 pumas, 2 gatos do mato e 1 jaguatirica) de vida livre provenientes dos biomas Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, cerrado e Pantanal. Utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFA), obtendo-se 5% das amostras positivas para *E. canis* (1 puma) e nenhuma para *A. phagocytophilum*. Em 2010, André et al. desenvolveram um trabalho mais amplo, utilizando além da

IFA, a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificar a presença de DNA de *E. canis* em amostras de sangue de 72 animais (29 jaguatiricas, 14 gatos do mato, 9 onças, 9 pumas, 6 jaguarundi, 3 gatos dos pampas, e 2 gatos maracajá) mantidos em cativeiro, provenientes do estado de São Paulo e de Brasília. Esse estudo resultou em de 7% das amostras positivas na IFA e 15% positivos na PCR. Widmer et al. (2011) pesquisaram anticorpos (IFA) e DNA (PCR) de agentes Rickettsiales em amostras de sangue de 10 onças de vida livre provenientes do Pantanal, não encontrando nenhuma amostra positiva pela PCR, entretanto, 40% foram positivos para *E. canis* e 10% para *R. parkeri* pela IFA. Em 2012, André et al. analisaram amostras de sangue de 99 felídeos cativos, provenientes do estado de São Paulo e Mato Grosso, dos quais 21% foram positivos pela PCR para *Ehrlichia* spp. (6 gatos do mato, 4 jaguatiricas, 4 pumas, 3 jaguarundis, 3 leões e 1 tigre), sendo 11 amostras semelhantes a *E. chaffeensis* e 10 semelhantes a *E. canis*, quando analisadas pelo BLAST. Também foram encontrados DNA de *Anaplasma* spp. em 4% das amostras (4 gatos do mato), sendo semelhante a *A. phagocytophilum* pelo BLAST. Até o presente, nenhum autor relacionou a presença desses agentes as alterações hematológicas de felídeos silvestres mantidos em cativeiro.

Esse trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de infecção natural por *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos no Distrito Federal e Goiás, Brasil, utilizando o método de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do DNA desses agentes em amostras de sangue total e as possíveis alterações hematológicas decorrentes destas infecções.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo teve autorização da Comissão de Ética para Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA- UnB) (UnB-DOC nº 130988/2015) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) (SISBIO nº 46097).

Amostras de sangue foram coletadas de 34 felídeos cativos, sem alterações clínicas aparentes, albergados no zoológico de Brasília, Distrito Federal (Zoo) e em um Centro Conservacionista de animais selvagens localizado no estado de Goiás (CC).

Os animais foram anestesiados utilizando-se dardos com anestésico tiletamina com zolazepam lançados por zarabatana na dose de 1,6 a 4,2mg/kg para grandes felinos, e até 11mg/kg para os pequenos felinos (Larsen et al. 2008). Foram coletados 5ml de sangue de cada animal utilizando-se seringas e agulhas descartáveis e acondicionados em tubos com EDTA, identificados e refrigerados para posterior análise laboratorial.

Para determinar o número de hemácias, leucócitos, plaquetas e a concentração de hemoglobina utilizou-se um contador hematológico veterinário semiautomático (Vet abc, HORIBA® Instruments Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). O volume globular (VG) foi determinado utilizando a técnica de micro-hematócrito. A contagem diferencial de leucócitos e a avaliação morfológica celular foram realizadas manualmente por meio da microscopia óptica a partir de esfregaços sanguíneos corados com panótico (Panótico NewProv®, Barueri, São Paulo, Brasil). Esse processo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UnB.

Armazenou-se uma parte de cada amostra de sangue a 4°C até à extração de DNA, que foi realizada utilizando kit comercial (Illustra Blood® genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare Technologies, Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20°C para posterior análise pela PCR. A extração de DNA e a PCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do Hospital Veterinário da UnB.

Todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R (Birkenheuer et al. 2003) para verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da PCR. A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para detecção do DNA de agentes da família Rickettsiaceae foram utilizados os oligonucleotídeos CS78 e CS323 (Labruna et al. 2004). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X já acrescido de MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM (Promega Corporation®, WI EUA), 10ng de DNA, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation®, WI EUA), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a PCR que detectou o DNA de *E. canis* utilizou-se os oligonucleotídeos ECAN5 e HE3 (Murphy et al. 1998). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> a 2mM (GE Health Care®, Little Chalfont, UK), 10ng de DNA, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 0,5U de Taq DNA polimerase (GE Health Care®, Little Chalfont, UK), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de

desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 63°C por 2 minutos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Na PCR para detecção do DNA de *A. platys* foram utilizados os oligonucleotídeos EHR16sr e Platys (Inokuma et al. 2000). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 3,2mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para detecção do DNA de *A. phagocytophilum* utilizou-se os oligonucleotídeos MSP3F e MSP3R (Levin et al. 2002). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X já acrescido de MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM (Promega Corporation®, WI EUA), 10ng de DNA, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation®, WI EUA), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (C1000 thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (0,2mg/µL) e observados no transiluminador fluorescente (UV transilluminator®, UVP LLC, Upland, CA). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados, genes amplificados e tamanhos dos produtos da PCR estão apresentados no Quadro 1.

Em todas as PCRs foram utilizados como controles negativos água ultra pura miliQ (estéril e desprovida de DNA). Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. obtidas de animais naturalmente infectados, identificados por meio da microscopia óptica e/ou PCR e confirmados por meio do sequenciamento genético.

Os dados foram analisados utilizando o programa computacional estatístico (SPSS versão 9.0, de 2008). Para teste de normalidade utilizou-se Shapiro-Wilk. Para as variáveis que seguiram distribuição

**Quadro 1. Descrição das seqüências de oligonucleotídeos, alvos e tamanho dos produtos da PCR utilizados para detecção de agentes Rickettsiales**

Oligonucleotídeos	Seqüência (5'-3')	Alvo	Pares de base	Referência
GAPDH-R	CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T	GAPDH	400	(Birkenheuer et al. 2003)
GAPDH-F	CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC			
CS78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	Família <i>Rickettsiaceae</i>	401	(Labruna et al. 2004)
CS323	GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T			
ECAN5	CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A	<i>Ehrlichia canis</i>	398	(Murphy et al. 1998)
HE3	TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TA			
EHR16sr	GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC	<i>Anaplasma platys</i>	678	(Inokuma et al. 2000)
Platys	GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG			
MSP3F	TGG TGG TGC GGG ATA TTT CTA TGT GCCC	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	179	(Levin et al. 2002)
MSP3R	ATT CCG AGG ATC AGG TGT G			



normal foi realizado teste T e para as que não seguiam a distribuição normal foi realizado o teste Mann-Whitney U. Considerou-se o intervalo de confiança de 95% para os dados hematológicos. Para análise de correlação entre os grupos e a origem ou sexo do animal, utilizou-se o Teste de Qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Foram utilizadas para o experimento amostras de sangue de 34 felídeos cativos provenientes do ZOO (n=21) e do CC (n=13). Esses animais eram de 9 espécies diferentes: 1 gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*), 1 gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), 3 gatos-palheiro (*Leopardus pajeros*), 2 jaguarundis (*Felis yagouaroundi*), 2 jaguatiricas (*Felis pardalis*), 2 leões (*Panthera leo*), 11 onças (*Panthera onca*), 7 suçuaranas (*Puma concolor*) e 5 tigres-de-bengala (*Panthera tigris tigris*). Dos animais utilizados, 15 eram fêmeas e 19 eram machos.

As trinta e quatro amostras testadas foram positivas na PCR para o gene GAPDH, apresentando um produto de 400pb,

denotando a qualidade do DNA utilizado e a ausência de inibidores da PCR (Fig.1A).

Nenhuma das amostras foi positiva para a família Rickettsiaceae (Fig.1B). Vinte e duas amostras (64,7%) foram positivas na PCR para *Anaplasma platys*, onde foram observados produtos nos tamanhos de 678pb (Fig.1C). Dentre essas amostras positivas, dois (5,88%) animais também foram positivos na PCR para *E. canis* (Fig.1D) e dois (5,88%) animais também foram positivos para *A. phagocytophilum* (Fig.1E), sendo consideradas coinfeções (Quadro 2). Pode-se constatar uma elevada taxa de infecção por *A. platys* nos animais amostrados em relação aos demais agentes estudados.

Hemograma foi feito em apenas 24 amostras coletadas. A análise obteve médias, desvio padrão, limites inferiores e superiores com intervalo de confiança de 95%. Na comparação dos valores entre os grupos, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os animais positivos e os animais negativos (Quadro 3). Contudo, merece destaque a análise individual dos hemogramas de dois animais, ambos positivos nas PCRs realizadas. O primeiro hemograma era de um gato maracajá, positivo para *E. canis* e

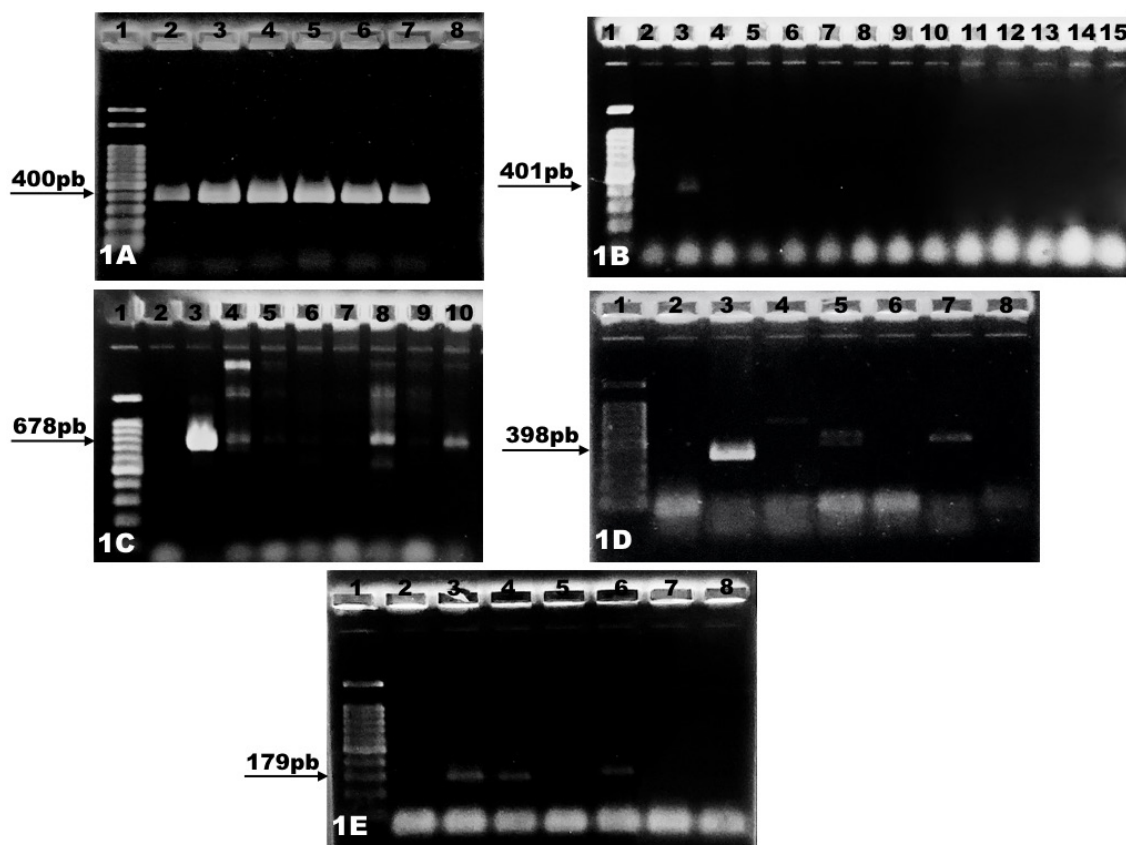


Fig.1. Eletroforese dos produtos da PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos, em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) para a detecção de DNA de agentes Rickettsiales em sangue de felídeos silvestres. (A) Amplificação do gene GAPDH (GAPDH-F e GAPDH-R, 400 pb), mostrando marcador de peso molecular (1), controle positivo (2), animais positivos (3-7), controle negativo (água) (8). (B) Detecção de DNA da família Rickettsiaceae (CS78 e CS323, 401 pb), mostrando marcador de peso molecular (1), controle negativo (água) (2), controle positivo (3), animais negativos (4-15). (C) Detecção de DNA de *Anaplasma platys* (EHR16sr e Platys, 678pb), mostrando marcador de peso molecular (1), controle negativo (água) (2), controle positivo (3), animais positivos (4-10), animais negativos (11-15). (D) Detecção de DNA de *Ehrlichia canis* (ECAN5 e HE3, 398pb), mostrando marcador de peso molecular (1), controle negativo (água) (2), controle positivo (3), animais positivos (5, 7), animais negativos (4, 6, 8). (E) Detecção de DNA de *Anaplasma phagocytophilum* (MSP3-R e MSP3-F, 179pb), mostrando marcador de peso molecular (1), controle negativo (água) (2), controle positivo (3), animais positivos (5, 7), animais negativos (4, 6, 8).

**Quadro 2. Resultados obtidos nas PCR de amostras de sangue de felídeos silvestres provenientes do zoológico (ZOO) e de um centro conservacionista de animais selvagens (CC)**

Identificação	Espécie	Local	Sexo	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Rickettsia</i> spp.
GJ	Gato Maracajá ( <i>Leopardus wiedii</i> )	ZOO	M	+	+	-	-
GM	Gato do Mato Pequeno ( <i>Leopardus tigrinus</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
GP01	Gato Palheiro ( <i>Leopardus pajerus</i> )	CC	M	-	+	-	-
GP02	Gato Palheiro ( <i>Leopardus pajerus</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
GP03	Gato Palheiro ( <i>Leopardus pajerus</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
JD01	Jaguarundi ( <i>Puma yagouaroundi</i> )	ZOO	F	-	-	-	-
JD02	Jaguarundi ( <i>Puma yagouaroundi</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
JG02	Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> )	CC	M	-	+	-	-
L01	Leão Africano ( <i>Panthera leo</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
L02	Leão Africano ( <i>Panthera leo</i> )	ZOO	M	-	+	-	-
OP01	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	ZOO	F	-	+	-	-
OP02	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	ZOO	F	-	+	-	-
OP03	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	M	-	-	-	-
OP04	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	M	-	-	-	-
OP05	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	M	-	+	-	-
OP06	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	F	-	+	-	-
OP07	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	ZOO	M	-	-	-	-
OP08	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	F	-	+	-	-
OP09	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	F	-	+	-	-
OP10	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	ZOO	F	-	+	-	-
SC01	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	ZOO	F	-	-	-	-
SC02	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	ZOO	F	-	-	-	-
SC03	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	ZOO	F	-	-	-	-
SC04	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	CC	M	-	-	-	-
SC05	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	CC	M	-	+	-	-
SC06	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	CC	F	-	-	-	-
SC07	Suçuarana ( <i>Puma concolor</i> )	CC	M	+	+	-	-
TB01	Tigre de Bengala ( <i>Panthera tigris</i> )	ZOO	F	-	-	-	-
TB02	Tigre de Bengala ( <i>Panthera tigris</i> )	ZOO	F	-	+	-	-
TB03	Tigre de Bengala ( <i>Panthera tigris</i> )	ZOO	F	-	+	-	-
TB04	Tigre de Bengala ( <i>Panthera tigris</i> )	ZOO	M	-	-	-	-
TB05	Tigre de Bengala ( <i>Panthera tigris</i> )	ZOO	M	-	-	-	-
JG01	Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> )	ZOO	F	-	+	+	-
OP11	Onça Pintada ( <i>Panthera onca</i> )	CC	M	-	+	+	-

**Quadro 3. Média, desvio padrão e limites inferiores e superiores dos parâmetros hematológicos de felídeos silvestres cativos de DF e GO**

Parâmetros hematológicos	Positivos (n=10)		Negativos (n=14)	
	Média e DP	IC (95%)	Média e DP	IC (95%)
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /mL)	6,25 ± 2,14	5,87 a 6,64	5,87 ± 2,56	5,41 a 6,34
Volume Globular (%)	33,29 ± 8,87	31,69 a 34,88	37,20 ± 8,20	35,72 a 38,68
Plaquetas	318.000 ± 130	294.000 a 341.000	241.000 ± 86,69	226.000 a 257.000
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /mL)	10.435 ± 3.991	9.716 a 11.155	10.420 ± 4.585	9.593 a 11.246
Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /mL)	8.338 ± 4.376	7.549 a 9.127	7.833 ± 4.241	7.068 a 8.597
Linfócitos	2.028 ± 739	1.894 a 2.161	1.887 ± 1.245	1.662 a 2.111
Eosinófilos	190 ± 178	158 a 222	271 ± 223	231 a 311
Monócitos	203 ± 142	178 a 229	312 ± 246	267 a 356

DP = desvio padrão, IC = intervalo de confiança (limites inferiores e superiores). Os animais foram divididos em grupo de positivos e negativos para agentes Rickettsiales, por meio da PCR. Não houve diferença significativa entre grupos para os valores das médias e de limites inferiores e superiores dos parâmetros hematológicos, considerando  $p \leq 0,05$ , pelo teste T e Mann-Whitney U.

*A. platys*, cujo eritograma apresentava uma severa anemia (VG = 13%, hemácias =  $2,44 \times 10^6$ , hemoglobina = 4,3g/dL). E o segundo hemograma de um gato palheiro, positivo para *A. platys* que apresentou trombocitopenia (plaquetas = 110.000/ $\mu$ L). Na avaliação do esfregaço sanguíneo deste animal foi observada inclusão característica de mórula de *A. platys* em uma plaqueta. Todos os demais animais, positivos ou negativos apresentaram hemogramas dentro dos valores de referência para as espécies estudadas.

Utilizando o Teste do Qui-quadrado ao nível de significância de 5%, não houve diferença significativa no número de animais positivos provenientes do ZOO e do CC, bem como também não houve diferença entre os sexos.

## DISCUSSÃO

As doenças infecciosas transmitidas por vetores artrópodes são reemergentes em todo o mundo, devido às mudanças climáticas e ao acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais, constituindo um grande desafio na medicina humana e veterinária. A proximidade entre os animais selvagens cativos, domésticos e humanos auxilia na transmissão de parasitas e amplia os potenciais reservatórios. Algumas espécies de Rickettsiales têm grande importância como causadores de doenças, tais como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* (Allison & Little 2013), *Rickettsia rickettsii* (Labruna 2009, Fortes et al. 2011, Oliveira et al. 2017), *R. parkerii*, *R. felis*, *R. typhi* (Fortes et al. 2011) e *A. phagocytophilum* (Vieira et al. 2011). Entretanto, ainda não está estabelecido quais desses agentes ocorrem em felídeos silvestres, tampouco quais alterações hematológicas causariam nesses animais.

Em nenhuma das amostras de sangue obtidas foi amplificado DNA de *Rickettsia* spp. por meio da PCR. Os felídeos desse estudo vivem na região do cerrado brasileiro, ambiente com grande população de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e gambás (*Didelphys* sp.), que são hospedeiros amplificadores de riquetsias, assim como transportadores de carrapatos potencialmente infectados, principalmente

*Amblyomma* spp. Sabe-se, entretanto, que esse carrapato é encontrado principalmente no Sudeste do país, onde se concentra também a maioria de casos de Febre Maculosa Humana (Krawczak et al. 2014). Nos últimos 16 anos, apenas 8 casos da doença foram diagnosticados em GO e 3 casos no DF, enquanto que no estado de São Paulo foram diagnosticados 813 casos (Brasil 2017). Outro aspecto a ser considerado é o desconhecimento acerca da patogenicidade de *Rickettsias* spp. para os felídeos silvestres ou se esses animais desenvolvem imunidade e são capazes de eliminá-las de seus organismos. Segundo Soares et al. (2015) esses agentes normalmente causam infecções transitórias em vertebrados, que duram apenas alguns dias, depois tornam-se imunorresistentes e não seria mais possível encontrar o DNA da *Rickettsia* no sangue do hospedeiro. O mesmo é passível de ocorrer nos felídeos silvestres. No presente estudo não foram realizados testes sorológicos para identificação de anticorpos para os agentes pesquisados, o que poderia ter auxiliado na avaliação da ocorrência ou não da infecção prévia com esses agentes na região. Widmer et al. (2011) encontraram anticorpos, mas não DNA, de espécies de *Rickettsias* em amostras de sangue de onças de vida livre do Pantanal. Em estudo com gatos domésticos, também foram encontradas amostras de sangue contendo anticorpos, mas nenhum DNA de *Rickettsia* foi identificado (Bayliss et al. 2009). Entretanto, Segura et al. (2014) encontraram soropositividade em 27,8% dos gatos estudados na Espanha e 10,8% amostras positivas na PCR. Não se sabe, entretanto, se esses gatos estavam na fase aguda da infecção. A espécie de *Rickettsia* presente também pode influenciar no ciclo do agente no organismo dos hospedeiros, facilitando ou não a detecção de seu DNA em sangue periférico.

A presença de DNA de *A. platys* foi encontrada na maioria das amostras analisadas (64,7%). *A. platys* é um microrganismo que infecta plaquetas, resultando em inclusões basofílicas denominadas mórulas, que causa a doença denominada trombocitopenia cíclica canina (Allison & Little 2013). Correa et al. (2011) investigaram a presença do DNA de *A. platys* em amostras de sangue de gatos domésticos em

Campos do Goytacazes/RJ, sendo detectada em 13,18% das amostras, sugerindo que gatos possam servir como potenciais reservatórios para esses agentes. Acredita-se que o mesmo possa ocorrer com os felídeos silvestres cativos que, talvez pelo convívio próximo com animais domésticos em algumas regiões, também se infectem com esses agentes tornando-se reservatórios.

A ocorrência de DNA de *E. canis* foi demonstrada em 5,88% das amostras analisadas, resultado inferior ao encontrado por André et al. (2010), que obtiveram 15% das amostras de felídeos silvestres cativos positivas. Em contrapartida, Widmer et al. (2011) realizaram um estudo com onças de vida livre do Pantanal e não encontraram nenhum animal positivo. Os animais positivos no presente estudo foram uma suçuarana e um gato-maracajá.

O DNA de *A. phagocytophilum* foi encontrado em 5,88% das amostras analisadas, resultado semelhante ao encontrado felídeos silvestres do zoológico de Sorocaba/SP, que foi de 4% em gatos-do-mato (André et al. 2012). A presença de DNA de *A. phagocytophilum* também foi relatada em oito pumas nos EUA (Foley et al. 1999). *A. phagocytophilum* é o agente causal da zoonose ehrlichiose granulocítica humana (Vieira et al. 2011). No presente estudo, os animais positivos para *A. phagocytophilum* foram negativos para *E. canis*, entretanto havia coinfeção com *A. platys*.

Os dados hematológicos dos felídeos silvestres positivos para agentes Rickettsiales do presente estudo não foram significativamente diferentes dos dados encontrados no grupo de animais negativos, mesmo quando houve coinfeção. A análise individual dos hemogramas realizados revelou que um animal co-infectado com *E. canis* e *A. platys* apresentou anemia e outro infectado com *A. platys* apresentou trombocitopenia, entretanto, como não foram realizados outros exames clínico-laboratoriais para averiguar a existência de outras afecções concomitantes, não foi possível inferir que estas alterações tenham sido decorrentes da infecção por estes agentes. Ainda é incerto se *A. platys* seja capaz de causar doença clínica em felídeos silvestres e quais as alterações hematológicas decorrentes desta infecção. Em gatos domésticos alterações como anemia e trombocitopenia foram relatadas, porém, os animais apresentavam outras doenças concomitantes (Hegarty et al. 2015). *E. canis* é o agente etiológico da erliquiose canina no Brasil, doença que se apresenta desde uma infecção inaparente até casos que levam ao óbito. A bactéria infecta leucócitos mononucleares, podendo causar alterações hematológicas como trombocitopenia, pancitopenia e linfocitose. Em gatos domésticos, já foi documentada a infecção natural e experimental por *Ehrlichia* spp. (Almosny 1998, Little 2010, Ebani & Bertelloni 2014, Maia et al. 2014) e assume-se que as alterações clínicas e laboratoriais nessa espécie sejam semelhantes às que ocorrem em cães (Almosny 1998, Little 2010, Braga et al. 2013). Braga et al. (2013) encontraram anemia, trombocitopenia e linfopenia nos gatos positivos na PCR para *E. canis*. Em felídeos silvestres, é incerto se essas bactérias causam alterações hematológicas. *A. phagocytophilum* já foi documentado em gatos domésticos causando anemia e trombocitopenia em animais doentes (Adaszek et al. 2013), entretanto, nenhum estudo havia sido realizado em silvestres.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho identificou a ocorrência da infecção por *Anaplasma Platys*, *Ehrlichia canis* e *A. phagocytophilum* em felídeos selvagens, o que sugere que estes animais podem servir como potenciais reservatórios destes agentes para humanos e outros animais.

Estudos futuros, com um número maior de animais, principalmente de vida livre, devem ser realizados no intuito de avaliar se estes microrganismos são capazes de ocasionar alterações clínicas e hematológicas nos felinos selvagens.

**Agradecimentos.**- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro. À Fundação Zoológica de Brasília e ao Centro Conservacionista por disponibilizarem os animais e o pessoal para a obtenção das amostras de sangue.

## REFERÊNCIAS

- Adaszek Ł., Gorna M., Skrzypczak M., Buczek K., Balicki I. & Winiarczyk S. 2013. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. *J. Feline Med. Surg.* 15(4):333-337. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X12466552>. PMID:23143840.
- Allison R.W. & Little S.E. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 42(2):127-144. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12040>. PMID:23647393.
- Almeida A.P., Cunha L.M., Bello A.C., Cunha A.P., Domingues L.N., Leite R.C. & Labruna M.B. 2011. A novel Rickettsia infecting Amblyomma dubitatum ticks in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2(4):209-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.08.003>. PMID:22108014.
- Almosny N.R.P. 1998. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 224p.
- André M.R., Adania C.H., Machado R.Z., Allegretti S.M., Felipe P.A., Silva K.F. & Nakaghi A.C. 2010. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. *J. Wildl. Dis.* 46(3):1017-1023. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.1017>. PMID:20688716.
- André M.R., Dumler J.S., Scorpio D.G., Teixeira R.H., Allegretti S.M. & Machado R.Z. 2012. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(4):247-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.002>. PMID:22749737.
- Bayliss D.B., Morris A.K., Horta M.C., Labruna M.B., Radecki S.V., Hawley J.R., Brewer M.M. & Lappin M.R. 2009. Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. *J. Feline Med. Surg.* 11(4):266-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2008.06.007>. PMID:18786845.
- Birkenheuer A.J., Levy M.G. & Breitschwerdt E.B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41(9):4172-4177. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>. PMID:12958243.
- Braga I.A., Santos L.G., Melo A.L., Jaune F.W., Ziliani T.F., Girardi A.F. & Aguiar D.M. 2013. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 22(4):470-474. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000400005>. PMID:24473870.
- Brasil 2017. Casos Febre Maculosa 2000 a 2017. Ministério da Saúde, Disponível em <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/Casos-de-febre-maculosa.pdf>>



- Coimbra H.S., Fernandes C.G., Soares M.P., Meireles M.C.A., Radamés R. & Schuch L.F.D. 2006. Ehrlichiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anatomo-patológicos e epidemiológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2):97-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200006>.
- Correa E.S., Paludo G.R., Scaloni M.C., Machado J.A., Lima A.C.Q., Pinto A.T.B., Thiebaut J.T.L. & Albernaz A.P. 2011. Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):899-909. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001000011>.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 2001. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt 6):2145-2165. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>. PMID:11760958.
- Ebani V.V. & Bertelloni F. 2014. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Central Italian healthy domestic cats. *Ticks Tick Borne Dis.* 5(6):668-671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.019>. PMID:25113987.
- Filoni C., Catão-Dias J.L., Bay G., Durigon E.L., Jorge R.S.P., Lutz H. & Hofmann-Lehmann R. 2006. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus and ehrlichia exposure in Brazilian free-ranging felids. *J. Wildl. Dis.* 42(2):470-477. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.470>. PMID:16870878.
- Foley J.E., Foley P., Jecker M., Swift P.K. & Madigan J.E. 1999. Granulocytic ehrlichiosis and thick infestation in mountain lions in California. *J. Wildl. Dis.* 35(4):703-709. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-35.4.703>. PMID:10574529.
- Fortes F.S., Santos L.C., Cubas Z.S., Barros-Filho I.R., Biondo A.W., Silveira I., Labruna M.B. & Molento M.B. 2011. Anti-*Rickettsia* spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11):1014-1018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001100013>.
- Fournier P.-E. & Raoult D. 2007. Bacteriology, taxonomy, and phylogeny of rickettsia, p.1-15. In: Parola P. (Ed.), *Rickettsial Diseases*. Informa Helthcare, London. <http://dx.doi.org/10.3109/9781420019971.001>.
- Hegarty B.C., Quorllo B.A., Thomas B., Park K., Chandrashekar R., Beall M.J., Thatcher B. & Breitschwerdt E.B. 2015. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. *Parasit. Vectors* 8(1):320. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0929-8>. PMID:26062723.
- Inokuma H., Raoult D. & Brouqui P. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38(11):4219-4221. PMID:11060094.
- Krawczak F.S., Nieri-Bastos F.A., Nunes F.P., Soares J.F., Moraes-Filho J. & Labruna M.B. 2014. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasit. Vectors* 7(7):7. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-7>. PMID:24387674.
- Labruna M.B. 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1166(1):156-166. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>. PMID:19538276.
- Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., Popov V., Gennari S.M. & Walker D.H. 2004. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 42(1):90-98. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>. PMID:14715737.
- Labruna M.B., Mattar S., Nava S., Bermudez S., Vazal J.M., Dolz G., Abarca K., Romero L., Sousa R., Oteo J. & Zavala-Castro J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revta MVZ Cordoba* 16(2):2435-2457. <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.282>.
- Larsen R.S., Kreeger T.J., West G., Heard D. & Caulkett N. 2008. Canids, p.395-407. In: Larsen R.S., Heard D. & Caulkett N. (Eds), *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. Blackwell Publishing Ltd, New Jersey.
- Levin M.L., Nicholson W.L., Massung R.F., Sumner J.W. & Fish D. 2002. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2(3):125-136. <http://dx.doi.org/10.1089/15303660260613693>. PMID:12737542.
- Little S.E. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. N. Am., Small Anim. Pract.* 40(6):1121-1140. PMID:20933140.
- Maia C., Ramos C., Coimbra M., Bastos F., Martins A., Pinto P., Nunes M., Vieira M.L., Cardoso L. & Campino L. 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasit. Vectors* 7(115):115. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-115>. PMID:24655431.
- Murphy G.L., Ewing S.A., Whitworth L.C., Fox J.C. & Kocan A.A. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79(4):325-339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00179-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00179-4). PMID:9831955.
- Oliveira C.S., Bräunig P., Krawczak F., Labruna M.B., Botton S.A., Vogel F.S.F. & Sangioni L.A. 2017. Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. *Pesq. Vet. Bras.* 37(1):52-57. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100009>.
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E. & Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(4):657-702. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00104-13>. PMID:24092850.
- Picoloto G., Lima R.F., Olegário L.A., Carvalho C.M., Lacerda A.C., Tomás W.M., Borges P.A., Pellegrin A.O. & Madruga C.R. 2010. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 19(3):186-188. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612010000300012>. PMID:20943025.
- Sacchi A.B., Duarte J.M., André M.R. & Machado R.Z. 2012. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35(4):325-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.02.001>. PMID:22381686.
- Segura F., Pons I., Miret J., Pla J., Ortuño A. & Noguera M.M. 2014. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasit. Vectors* 7:353. PMID:25084969.
- Soares H.S., Barbieri A.R., Martins T.F., Minervino A.H., de Lima J.T., Marcili A., Gennari S.M. & Labruna M.B. 2015. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Exp. Appl. Acarol.* 65(1):125-140. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-014-9851-6>. PMID:25273064.
- Vieira R.F., Biondo A.W., Guimarães A.M., Santos A.P., Santos R.P., Dutra L.H., Diniz P.P., Morais H.A., Messick J.B., Labruna M.B. & Vidotto O. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 20(1):1-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000100002>. PMID:21439224.
- Widmer C.E., Azevedo F.C.C., Almeida A.P., Ferreira F. & Labruna M.B. 2011. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(8):1001-1005. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0619>. PMID:21612532.