

DOENÇAS RICKETTISIAIS EM FELINOS DOMESTICOS: ASPECTOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

Lima A.C.Q.¹, Corrêa E.S.², Melo Junior O.A.³, Paludo G.R.⁴, Albernaz A.P.⁵

¹UENF/ Hospital Veterinário, Laboratório de Sanidade Animal, carolina1307@gmail.com

²UENF/ Hospital Veterinário, Laboratório de Sanidade Animal, elisabetesales@gmail.com

³UENF/ Hospital Veterinário, Laboratório de Sanidade Animal, melojr@uenf.br

⁴UnB/ Laboratório Pat. Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Veterinária, giane@unb.br

⁵UENF/ Hospital Veterinário, Laboratório de Sanidade Animal, albernaz@uenf.br

Resumo – Técnicas moleculares para detecção de bactérias da ordem Rickettsiales permitem diagnóstico rápido, sensível e específico pela identificação de sequências específicas do DNA dos microrganismos. Obtiveram-se esfregaços de sangue periférico de 55 gatos atendidos no Hospital Veterinário da UENF, corados com panótico e visualizados à microscopia óptica com objetiva de imersão, buscando corpúsculos elementares em leucócitos e plaquetas. Dos gatos positivos, foram coletadas amostras de sangue para realizar hemograma e bioquímica sérica. O DNA foi extraído a partir das amostras com EDTA, com a utilização de kits comerciais. Estimou-se que 10,9% dos gatos foram positivos para Rickettsiales na hematoscopia. Observaram-se mórulas apenas em plaquetas, elucidando a trombocitopenia em 100% dos gatos. Não se confirmou alterações eritrocitárias ou leucocitárias condizentes com doenças rickettsiais felina. Alterações da bioquímica sérica estavam relacionadas às patologias primárias dos gatos envolvidos neste estudo. Não houve evidência molecular de *Ehrlichia canis* nos gatos estudados. Tornam-se necessárias investigações moleculares para a caracterização da Rickettsiose felina.

Palavras-chave: Rickettsiales, *Ehrlichia canis*, PCR

Área do Conhecimento: Medicina Veterinária

Introdução

São muitas as hemoparasitoses de gatos de importância médica e médica-veterinária devido ao seu potencial zoonótico. Destacam-se bactérias Gram-negativas da ordem Rickettsiales (ALMOSNY & MASSARD, 1999; BRENNER et al., 2004; DUMLER et al., 2001). A maioria dos gatos acometidos é assintomática, constituindo-se num risco maior por não serem identificados como portadores (ALMOSNY & MASSARD, 1999).

O diagnóstico presuntivo de doenças Rickettsiais é baseado num conjunto de alterações clínicas e hematológicas

(ALMOSNY & MASSARD, 1999; DAGNONE et al., 2001). Para o diagnóstico definitivo, métodos de detecção do agente ou de anticorpos específicos estão atualmente disponíveis (DAGNONE et al., 2001; LAPPIN et al., 2004; AGUIAR et al., 2007; WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998).

As técnicas moleculares para detecção dos agentes permitem diagnóstico rápido, sensível e específico para a Rickettsiose em diferentes fases da doença. Assim, a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase é capaz de identificar as espécies pela detecção de sequências específicas no DNA dos microrganismos (MACHADO, 2004; ALVES

et al., 2005; MARSILIO et al., 2006; VINASCO et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos hematológicos e bioquímicos, além de investigar a presença de *Ehrlichia canis* como agente causativo de doença riquetsial em gatos domésticos na cidade de Campos dos Goytacazes RJ, utilizando PCR.

Metodologia

Foram examinados 55 gatos, independente de raça ou sexo, provenientes da clínica médica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF). Obtiveram-se esfregaços sanguíneos de sangue periférico da ponta de orelha de todos os animais, corados com panótico rápido e visualizados à microscopia óptica com objetiva de imersão, buscando corpúsculos elementares em leucócitos e plaquetas, caracterizando a positividade para Rickettsiales. Dos gatos com resultado positivo, foram coletados 5 mL de sangue venoso: 3 mL em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% para realizar o hemograma no equipamento automatizado da marca Mindray®, modelo BC 2800Vet; 2 mL em tubos sem anticoagulante visando obtenção de soro para realizar os testes bioquímicos, utilizando-se kits da marca Labtest®, em equipamento automatizado da marca Bayer®, modelo Express plus, mensurando-se proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, alanina aminotransferase, uréia e creatinina.

O DNA foi extraído a partir das amostras com EDTA, com a utilização de kits comerciais (Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE healthcare®), seguindo as recomendações do fabricante. Em todas as Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizaram-se controles negativos e positivos para avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a sensibilidade da reação,

respectivamente. Como controle negativo, foi utilizado água e como controle positivo foi utilizado DNA de animal infectado por *Ehrlichia canis*.

Os primers EBR1 (5'-CCTCTGGCTATAGGAAATTG-3') e EBR5 (5'-GGAGTGCTTAACGCGTTAG-3') foram empregados para identificar sequências específicas do gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis* (ALVES et al., 2005). À mistura de PCR adicionou-se: 10pmol de cada primer, 10mM Tris – HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,25µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2U de Taq platinum DNA polymerase e 10µl do DNA da amostra, em um volume total de 50µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR com 765 pb foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, fotografados em transluminador sob luz UV. Todas as reações foram efetuadas no termociclador (Biorad®).

As amostras que se apresentaram negativas na PCR foram submetidas a uma segunda reação para testar a qualidade da extração do DNA e reduzir a quantidade de falsos negativos devido à presença de inibidores da PCR. Para isto foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH-F (5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3') e GAPDH-R (5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC-3') que anelam em uma sequência específica do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e resulta em um produto de 400 pb (BIRKENHEUER et al., 2003).

Resultados

Foram utilizadas 55 amostras de sangue de gatos, todos sem raça definida, machos e fêmeas de diferentes idades. Destes animais, 6

(10,9%) apresentaram inclusões basofílicas em plaquetas. No exame clínico realizado no momento da colheita das amostras de sangue, um animal apresentou ascite e carcinoma de glândula mamária com metástase esplênica confirmada por ultrassonografia. Outro animal evidenciou quadro diarreico e uma gata estava gestante. Os demais (50%) não apresentaram nenhuma alteração clínica aparente. Todos tinham acesso extradomiciliar e infestação por pulgas. Dois gatos (33,3%) não receberam nenhuma vacinação e os demais (66,7%) só foram imunizados contra raiva.

Quanto aos parâmetros hematológicos, não foram observadas alterações no eritrograma dos animais testados (Jain, 1993). Na leucometria, observou-se leucocitose apenas em uma amostra e leucopenia em duas amostras de sangue dos felinos com inclusões basofílicas em plaquetas (Jain, 1993).

Quanto a leucometria específica, (em valores absolutos) um animal (17%) apresentou eosinofilia. Dois gatos (33,3%) com neutrofilia, sendo um com DNNE leve. Houve alterações linfocitárias em quatro gatos, sendo que três apresentaram linfocitopenia e um linfocitose. Todos os animais apresentaram trombocitopenia (Jain, 1993).

Na avaliação dos testes de bioquímica sérica os valores para γ -glutamil transferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e creatinina se mantiveram dentro dos padrões de normalidade¹⁶. Observaram-se hiperproteinemia com hiperglobulinemia em 50% gatos. Quatro animais apresentaram hipoalbuminemia. Todos os animais apresentaram uremia (Kaneko et al., 2008).

Na PCR, quando se utilizou os oligonucleotídeos EBR-1 e EBR-5 não foram observados produtos no tamanho de 765 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis*.

Todas as amostras foram testadas com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R, que amplificam uma parte do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, apresentaram uma banda de 400 pb, indicando êxito nas extrações de DNA.

Discussão

Em pesquisa de hemocitozóários em esfregaços sanguíneos de gatos observa-se a presença de inclusões basofílicas em plaquetas, neutrófilos, linfócitos e monócitos (ALMOSNY & MASSARD, 1999; ALMOSNY, 1998). No presente trabalho apenas foram observadas inclusões basofílicas em plaquetas, estando estes dados de acordo com resultados obtidos por ALMOSNY (1998) que observou presença de plaquetas gigantes contendo inclusões basofílicas na fase aguda da doença em esfregaço sanguíneo de gatos infectados experimentalmente (ALMOSNY, 1998).

As alterações bioquímicas observadas em 4 animais não parecem estar relacionadas a doenças rickettsiais dos felinos, mas sim às patologias primárias de cada animal. Em 2003, SOUZA et al. (2003) descreveram que animais naturalmente infectados por *E. canis* e *E. granulocítica* revelaram anemia normocítica e normocômica, leucopenia, trombocitopenia, hiperproteinemia com hiperglobulinemia (SOUZA, 2003). Dois animais assintomáticos do presente estudo apresentaram estas alterações, com exceção das alterações eritrocitárias. Mesmo que os animais estejam assintomáticos, eles são portadores da doença Rickettsial. As Rickettsioses não parecem produzir doença clínica grave nos gatos (LAPPIN et al., 2004; SOLANO-GALLEG0 et al., 2006; SANTIAGO, 2010). Em nosso estudo, 100% dos gatos apresentaram trombocitopenia, como acontece nas rickettsioses caninas. Entretanto não podemos afirmar que este sinal seja de doença rickettsial

felina, sendo necessárias maiores investigações (SANTIAGO, 2010).

O Protocolo de PCR usado nesse estudo, não identificou *Ehrlichia sp.* em nenhuma das amostras testadas (0%). As doenças causadas por Rickettsiales são menos comuns em felinos do que em cães, porém não menos importantes (ALMOSNY, 1998; BREITSCHWERDT et al., 2002; INOKUMA et al., 2001; OLIVEIRA, 2008).

Os oligonucleotídeos do Gene EBR aplicam o DNA da *Ehrlichia canis*, mas não de outros organismos rickettsiais incluindo *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii* ou *Rickettsia typhi* que podem acometer tanto os cães como os gatos.

Estudos realizados em 168 gatos na Espanha em 2006, não identificaram por PCR nenhum gato positivo para *E. canis* (ALMOSNY & MASSARD, 1999). Foram investigados 680 gatos de 2005 a 2008, em Madrid e, em nenhum deles identificou-se DNA de *E. canis* em PCR (ALMOSNY, 1998). O que corrobora tanto com esse trabalho como com diversos outros que também não identificaram *E. canis* por PCR^{23,24,25,26}. Alguns autores identificaram *E. canis* em gatos (BREITSCHWERDT, 2002; BEAUFILS et al., 2002; BREITSCHWERDT, 2003), porém, TABAR et al. (2008) observaram o DNA de *E. canis*/*Anaplasma spp* em 1 % de gatos, mas sem resultados conclusivos no sequenciamento (TABAR et al., 2008).

Conclusão

Estima-se que 10,9% dos gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense são positivos para Rickettsiales na hematoscopia. Só se observou mórulas em plaquetas. Não se confirma alterações eritrocitárias ou leucocitárias condizentes com doenças rickettsiais de

felinos domésticos. As alterações observadas na bioquímica sérica estão relacionadas a patologias primárias dos gatos envolvidos neste estudo. Todos os animais apresentaram trombocitopenia, podendo ser uma evidência de rickettsiose. Não existe evidência molecular de infecção por *Ehrlichia canis* nos gatos com inclusão basofílicas em plaquetas. Tornam-se necessárias maiores investigações moleculares para a caracterização da Rickettsiose felina.

Referências

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural** 37(3): 796-802, 2007.
- AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINS, A. Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique. **Ann N Y Acad Sci** 1026: 103-105. 2004.
- ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação Parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase adulta de cães e gatos experimentalmente infectados. 202p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose felina – revisão. **Clínica Veterinária** 4(23): 30-32, 1999.
- ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira** 6: 49-54, 2005.
- ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia

Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira** 6: 49-54, 2005.

BEAUFILS, J. P.; BREITSCHWERDT, E.B.; HANCOCK, S.I.; HEGARTY, B.C.; MARTIN-GRANEL, J. Ehrlichiose felina: identification genetique de l'agent chez deux chats. **Pract Med Chir Anim Comp** 37: 235-238. 2002.

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**, 41: 4172-4177, 2003.

BREITHSCHWERDT, E.B. Anine and feline ehrlichiosis: new developments. 19th Annual Congress of the ESVD-ECVD, Tenerife, Spain. 2003.

BREITSCHWERDT, E.B.; ANTHONY, C.G.; ABRAMS-OGG, A.C.G. *et al.* Molecular evidence supporting Ehrlichia canis-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 16, 6: 642-649, 2002.

BRENNER, D.J.; KRIEG N.R.; STALEY, J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, 2004.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ci. Agrárias** 22(2): 191-201, 2001.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J. 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 news species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51(6): 2145-2165, 2001.

EBERHARDT, J.M.; NEAL, K.; SHACKELFORD, T.; LAPPIN, M.R.

Prevalence of selected infectious disease agents in cats from Arizona. **J Feline Med Surg** 8(3): 164-168. 2006.

INOKUMA, H.; PAROLA P.; RAOULT, D. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi prefecture, Japan. **Veterinary Parasitology** 99(4):, 335-339, 2001.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. 1^a ed., **Lea and Febiger**, Philadelphia, 417 p, 1993.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. L.Clinical biochemistry of domestic Animals, 6^a.ed. **Academic Press**, San Diego, 916p. 2008.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 225(6): 893-896, 2004.

MACHADO, R.Z. *Ehrlichiose canina*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 13: 53-57, 2004.

MARSILIO, F.; MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDINI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (*gltA*) gene from various Italian strains. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18: 215-217, 2006.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.** 79: 325-339,1998.

OLIVEIRA, L.S. Investigação Molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/ MG. Viçosa – MG, 75p. 2008. **Dissertação (mestrado) UFV**

ORTUNO, A.; GAUSS, C. B.; GARCIA, F.; GUTIERREZ, J.F. Serological evidence of Ehrlichia spp. exposure in cats from northeastern Spain. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health** 52(5): 246-248. 2005.

SANTIAGO, T.A. Enfermedades vectoriales en gatos de la comunidad de madrid: estudio Serológico, molecular y Epidemiológico de la infección por *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp, *Neorickettsia* spp, *Leishmania* spp y *Bartonella* spp. Madrid, Espanha. 319p. Tese (Doutorado). Universidad Complutense De Madrid. 2010

SOLANO-GALLEGO, L., HEGARTY, B.; ESPADA, Y. LLULL, J. BREITSCHWERDT, E. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Vet Microbiol** 118(3-4): 274-277, 2006.

SOUZA, H.J.M. Colê tâneas em Medicina e Cirurgia Felina. 1ª ed., **L.F. Livros**, Rio de Janeiro, 475 p, 2003.

TABAR, M.D.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Vet Parasitol** 151(2-4): 332-336. 2008.

VINASCO, J.; LI, O.; ALVARADO, A.; DIAZ, D. HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C. MORO, M. H. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. **J. Clin. Microbiol.** 45: 2716–2719, 2007.

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Vet Res Commun** 29 Suppl 2: 319-321. 2005.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1852–1855, 1997.