

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- ICB  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

MARIANA CRISTINA SEBASTIANI

**LEVANTAMENTO DE HEMOPATÓGENOS,  
ECTOPARASITOS E SOROPREVALÊNCIA DE *Toxoplasma  
gondii* EM GATOS COMUNITÁRIOS DO PARQUE  
MUNICIPAL AMÉRICO RENNÉ GIANNETTI DE BELO  
HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

BELO HORIZONTE

2021

MARIANA CRISTINA SEBASTIANI

**LEVANTAMENTO DE HEMOPATÓGENOS,  
ECTOPARASITOS E SOROPREVALÊNCIA DE *Toxoplasma  
gondii* EM GATOS COMUNITÁRIOS DO PARQUE  
MUNICIPAL AMÉRICO RENNÉ GIANNETTI DE BELO  
HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia  
Área de concentração: Protozoologia

**Orientação:** Profa. Dra. Julia Angélica Gonçalves da Silveira

**Coorientação:** Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

BELO HORIZONTE

2021

- 043 Sebastiani, Mariana Cristina.  
Levantamento de hemopatógenos e soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em gatos comunitários do Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Mariana Cristina Sebastiani. – 2021.
- 103 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Julia Angélica Gonçalves da Silveira. Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Gato. 3. Toxoplasmose. 4. Zoonoses. 5. Parque Municipal Américo Renê Giannetti (Belo Horizonte, MG). I. Silveira, Julia Angélica Gonçalves da. II. Vitor, Ricardo Wagner de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

DEFESA DISSERTAÇÃO - 426/21

**TÍTULO: "INVESTIGAÇÃO DE HEMOPATÓGENOS E SOROEPIDEMIOLOGIA DE TOXOPLASMA GONDII EM GATOS COMUNITÁRIOS DO PARQUE MUNICIPAL AMÉRICO RENNÉ GIANNETTI DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL"**

**ALUNA: MARIANA CRISTINA SEBASTIANI**

### ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **quatorze de julho de 2021**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Erica Munhoz de Mello**

PBH - Centro de controle de zoonoses -CC

**David Soeiro Barbosa**

UFMG

**Ricardo Wagner de Almeida Vitor** - Coorientador

UFMG

**Júlia Angélica Gonçalves da Silveira**- Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 14 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 08/09/2022, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1740049** e o código CRC **44C39F8F**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais Valdir e Maria e a minha irmã Juliana e ao meu cunhado Jefferson que sempre foram os primeiros a me apoiar em minhas escolhas e fizeram o possível para que elas se tornassem realidade durante esses anos em Belo Horizonte.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e todos os seus membros, que se empenham para que alunos e alunas tenham uma formação de excelência.

À minha orientadora Profa. Julia, que me deu a oportunidade e estrutura de trabalhar com essas amostras pelas quais me dediquei com grande responsabilidade a fim de poder contribuir, mesmo que pouco, com os estudos dos gatos do PqMARG.

Ao meu coorientador Prof. Ricardo Vitor, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e que além de ter contribuído com seu conhecimento para este trabalho, me auxiliou em diversas questões sempre de forma muito empática e com muita sabedoria.

À Paloma e Profa. Danielle, que desde o início do projeto, contribuíram para que este pudesse ser feito da melhor maneira possível.

À Profa. Camila Oliveira, que me ajudou nas análises dos resultados e sempre esteve disposta para minhas dúvidas.

À Andreina, minha amiga e parceira de laboratório, que sempre com seu otimismo me deu forças para continuar até mesmo nos momentos mais difíceis, além de ter me ajudado sempre desde que entrei no ICB e contribuiu de forma ímpar para minha formação, sendo uma excelente profissional e pesquisadora.

Ao Centro de Controle de Zoonoses, em especial Silvana, Érica, Agentes de Combate a Endemias, veterinários e demais profissionais da prefeitura de Belo Horizonte que de alguma forma contribuíram e ainda contribuem para este projeto.

À Rosa, técnica do Laboratório de Toxoplasmose, que com sua eficiência, carinho e amor

pelo que faz, contribuiu com toda sua experiência e competência para este trabalho, além de sempre ter uma mensagem motivadora que tornavam meus dias menos ruins.

À Gabi, que também sempre me recebeu de braços abertos e disposta a ajuda com quaisquer dúvidas.

A todos os meus colegas e amigos da turma de mestrado 2019, em especial a Talita, que com certeza fizeram dessa experiência na pós-graduação muito mais leve.

Ao Hudson, que também sempre me ajudou nos momentos que eu mais precisei e também aos demais integrantes do Laboratório de Protozoologia Veterinária.

À Sumara e Sibebe, que sempre estiveram dispostas a ajudar e orientar os alunos do programa de pós-graduação da melhor forma possível.

À Maria Elizabeth, que desde 2017 tem sido essencial no meu processo diário na busca por ser uma pessoa melhor.

Aos amigos que fiz nesses quatro anos em BH, às minhas parceiras de apartamento Fernanda e Layanne e aqueles, que mesmo de longe, sempre tentaram fazer o máximo para tornar esta caminhada menos pesada.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e, em especial ao CNPq, por ter tornado todo este trabalho possível.

*“Aonde fica a saída?”, Perguntou Alice ao gato que ria. “Depende”, respondeu o gato. “De quê?”, replicou Alice; “Depende de para onde você quer ir...”*

**Lewis Carrol**

## RESUMO

O aumento da população de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) errantes e ferais em áreas urbanas pode culminar em um importante problema para a saúde animal, ambiental e humana. Sabe-se que o Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG) localizado na região central de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil é uma importante área verde da cidade por abrigar diversas espécies de animais silvestres e por receber um grande número de visitantes. O local abriga também animais domésticos, como gatos, que se organizam socialmente em colônias e até o momento, não existem informações sobre o *status* sanitário destes animais em relação a agentes parasitários como hemopatógenos veiculados por vetores e *Toxoplasma gondii*, sendo que os felinos desempenham importante papel epidemiológico na toxoplasmose. O presente trabalho tem como principal objetivo a detecção de hemoprotozoários da ordem Piroplasmida e *Trypanosoma evansi*, além de hemobactérias da família Anaplasmataceae e *Mycoplasma* spp. hemotrópicos, e determinar a soroprevalência de *Toxoplasma gondii* nos gatos abrigados no parque. O estudo foi do tipo observacional transversal realizado através da análise de um banco de amostras biológicas (ectoparasitos, sangue e soro) coletadas entre os anos de 2015 a 2018. Foram encontrados espécimes de pulgas (*Ctenocephalides felis felis* e *C. canis*) e piolhos (*Felicola subrostratus*) e, foram detectadas infecções por *Cytauxzoon felis*, *Trypanosoma evansi*, *Anaplasma platys* e micoplasmas hemotrópicos (*Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus* Mycoplasma haemominutum’ e ‘*Candidatus* Mycoplasma turicensis. As amostras foram negativas para os *primers* utilizados para detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*. A soroprevalência para *T. gondii* foi de 19,6% no teste RIFI e 21% no ELISA. Os resultados apontam que a circulação de agentes transmitidos por vetores ocorre nos gatos do PqMARG, assim como os dados de soroprevalência para *T. gondii* podem servir como indicador da contaminação ambiental por este agente de importância em saúde pública. O papel dos felinos na epidemiologia de patógenos transmitidos por vetores ainda permanece com muitas lacunas e, portanto, mais estudos são necessários para elucidar se estes animais podem exercer alguma pressão na cadeia de transmissão destes agentes, principalmente os de importância na saúde humana.

**Palavras-chave:** felinos; hemoparasitose; toxoplasmose; parque urbano; zoonose



## ABSTRACT

The increase in the population of stray and feral cats (*Felis silvestris catus*) in urban areas can lead to a major problem for animal, environmental and human health. It is known that the Américo Renné Giannetti Municipal Park (PqMARG) located in the central region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil is an important green area of the city as it houses several species of wild animals and receives a large number of visitors. The place is also home to domestic animals, such as cats, which are socially organized in colonies and so far, there is no information on the health status of these animals in relation to parasitic agents such as vector-borne pathogens and *Toxoplasma gondii*. The main objective of this work is the detection of hemoprotozoa of the order Piroplasmida and *Trypanosoma evansi*, in addition to hemobacteria of the Anaplasmataceae family and *Mycoplasma* spp. and to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats housed in the park. The study was a cross-sectional observational study carried out through the analysis of a bank of biological samples (ectoparasites, blood and serum) collected between the years 2015 to 2018. Specimens of fleas (*Ctenocephalides felis felis* and *C. canis*) and lice (*Felicola subrostratus*) were found and infections by *Cytauxzoon felis*, *Trypanosoma evansi*, *Anaplasma platys* and hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum* and 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*') were detected. The samples were negative for the primers used to detect *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum*. The seroprevalence for *T. gondii* was 19,6% using IFA and 21% using ELISA. The results show that the circulation of agents transmitted by vectors occurs in cats from PqMARG, as well as seroprevalence data for *T. gondii* can serve as an indicator of environmental contamination by this agent of public health importance. The role of felines in the epidemiology of vector-borne-diseases still has many gaps and, therefore, further studies are needed to elucidate whether these animals can exert any pressure on the transmission chain of agents, especially those of human health importance.

**Keywords:** felines; hemoparasitosis; toxoplasmosis; urban park; zoonosis

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Localização geográfica do Parque Municipal Américo Renné Giannetti na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.....**41**
- Figura 2-** Fluxo dos gatos capturados no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG.....**42**
- Figura 3-** Fluxograma apresentando a sequência das reações de PCR realizadas para as amostras dos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG.....**49**
- Figura 4-** Ilustração dos pontos com maior número de capturas de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG que tiveram material enviado ao Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB-UFMG) entre os anos de 2015 a 2018.....**59**
- Figura 5-** Plaqueta apresentando inclusão basofílica sugestiva de *Anaplasma platys* em lâmina de um gato do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG.....**61**
- Figura 6-** Estrutura semelhante à merozoítos encontrada em hemácia de um gato do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG .....**61**
- Figura 7-** Gel de agarose 1% em que é possível observar exemplos de amostras positivas pela *nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados na sequência parcial do gene 18S rRNA para a pesquisa de parasitos pertencentes a ordem Piroplasmida.....**62**
- Figura 8-** Gel de agarose 1,5% em que é possível observar exemplos de amostras positivas pela *semi-nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados no alvo ITS para a pesquisa de *Trypanosoma evansi*.....**62**
- Figura 9-** Gel de agarose 1% em que é possível observar exemplos de amostra positiva pela *nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA para a pesquisa de *Ehrlichia/ Anaplasma* de agranulócitos.....**63**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Descrição das frequências encontradas na população de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG, que tiveram amostras colhidas, em relação ao ano de captura, sexo e idade.....**57**
- Tabela 2-** Pontos dentro do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG com as respectivas frequências de capturas dos animais que tiveram material enviado ao Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB-UFMG) durante os anos de 2015 a 2018.....**58**
- Tabela 3-** Distribuição numérica e frequência de gatos ectoparasitados provenientes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de 2015 a 2018.....**60**
- Tabela 4-** Distribuição numérica e frequência de gatos PCR positivos provenientes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de 2015 a 2018.....**64**
- Tabela 5-** Frequência de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti que apresentaram coinfeção com mais de uma espécie de micoplasma hemotrópico entre 209 gatos estudados.....**64**
- Tabela 6-** Resultados moleculares para os hemopatógenos pesquisados nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de acordo com o sexo.....**66**
- Tabela 7-** Resultados moleculares para os hemopatógenos pesquisados nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de acordo com a faixa etária.....**67**
- Tabela 8-** Prevalência de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG soropositivos nos testes sorológicos de acordo com sexo e faixa etária.....**70**
- Tabela 9-** Resultados da análise da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, precisão de diagnóstico, índice *Kappa*, valor preditivo positivo e negativo do teste ELISA utilizando como teste padrão ouro a RIFI (1:16) em 209 amostras de soro de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletadas entre os anos de 2015 a 2018.....**71**
- Tabela 10-** Combinação de soropositividade e/ou infecção observada nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG durante o período de 2015 a 2018.....**73**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** Iniciadores, alvos, tamanho do fragmento (em pares de base- pb) e referências na literatura utilizados para as reações de PCR do tipo convencional, *nested* e *semi-nested*.....**46**
- Quadro 2-** Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo *nested*, *semi-nested* PCR para os alvos pesquisados com as respectivas temperaturas de cada etapa do ciclo e sua duração.....**48**
- Quadro 3-** Programas utilizados para as reações de PCR convencional para os alvos pesquisados com as respectivas temperaturas de cada etapa do ciclo e sua duração.....**48**
- Quadro 4-** Identidade do DNA das espécies hemoplasmas encontradas em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG a partir de sequência parcial do gene 16S rRNA.....**65**

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Frequência de títulos de anticorpos nos soros de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletados entre os anos de 2015 a 2018 que foram positivos na RIFI.....**69**

**Gráfico 2** - Frequência dos índices de reatividade apresentados nos soros de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletados entre os anos de 2015 a 2018 que foram positivos pelo teste ELISA.....**69**

## LISTA DE ABREVIATURAS

MgCl<sub>2</sub>– Cloreto de Magnésio

kB– Quilobyte

mM– Milimolar

mL– Mililitros

mA– Miliampere

nm- Nanômetro

µg– Micrograma

µM– Micromolar

µL– Microlitro

M– Molar

pb– Pares de base

q.s.p– quantidade suficiente para

V– Volts

## LISTA DE SIGLAS

- ACE– Agente de Combate a Endemias
- CCZ– Centro de Controle de Zoonoses
- CED– Capturar- Esterilizar- Devolver
- CMhm– ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’
- CMt– ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’
- DF– Distrito Federal
- DNA– Ácido desoxirribonucleico
- dATP– Desoxiadenosina trifosfatada
- dGTP– Desoxiguanosina trifosfatada
- dCTP– Desoxicitidina trifosfatada
- dTTP– Desoxitimidina trifosfatada
- EDTA– *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EUA– Estados Unidos da América
- ELISA– *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
- FIV– Vírus da Imunodeficiência Felina
- FeLV– Vírus da Leucemia Felina
- HAI– Reação de Hemaglutinação Indireta
- HIV– Vírus da Imunodeficiência Humana
- ICB– Instituto de Ciências Biológicas
- IgG– Imunoglobulina G
- IR– Índice de Reatividade
- MA– Maranhão
- MG– Minas Gerais

Mhf– *Mycoplasma haemofelis*

ONG– Organização não-governamental

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PB– Paraíba

PBH– Prefeitura de Belo Horizonte

PqMARG– Parque Municipal Américo Renné Giannetti

PBS– *Phosphate Buffered Saline*

PBS-T– *Phosphate Buffered Saline com Tween*

RJ– Rio de Janeiro

RIFI– Reação de Imunofluorescência Indireta

rRNA– Ácido ribonucleico ribossômico

SC- Santa Catarina

SMSA– Secretaria Municipal de Saúde

SST– Solução Salina Tamponada

SRD– Sem raça definida

TAE– Tampão Tris-Acetato-EDTA

TNR– *Trap- Neuter- Return*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV– Ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. Organização social do gato doméstico e impactos de sua superpopulação em ambientes urbanos</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2. O contexto do Parque Municipal Américo Renné Giannetti</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3. Ectoparasitos e hemopatógenos em felinos domésticos</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.1. Ectoparasitos</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.2. Hemoprotozoários</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.2.1. Ordem Piroplasmida</b> .....	<b>24</b>
1.3.2.1.1. <i>Cytauxzoon felis</i> .....	24
1.3.2.1.2. <i>Babesia</i> .....	26
<b>1.3.2.2. <i>Trypanosoma evansi</i></b> .....	<b>28</b>
<b>1.3.3. Bactérias</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3.3.1. Micoplasmas hemotrópicos</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3.3.2. Família Anaplasmataceae</b> .....	<b>31</b>
1.3.3.2.1. <i>Ehrlichia</i> spp.....	32
1.3.3.2.2. <i>Anaplasma</i> spp.....	33
<b>1.4. <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>35</b>
<b>1.4.1. Biologia e Transmissão</b> .....	<b>35</b>
<b>1.4.2. Toxoplasmose felina</b> .....	<b>36</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. Tipo de estudo</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2. Área do estudo</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3. Captura, identificação e encaminhamento dos gatos ao Centro de Controle de Zoonoses</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4. Coleta de amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5. Análises laboratoriais</b> .....	<b>43</b>
<b>4.5.1. Locais de realização das análises laboratoriais</b> .....	<b>43</b>

<b>4.5.2. Análises parasitológicas.....</b>	<b>43</b>
4.5.2.1. Identificação dos ectoparasitos .....	43
4.5.2.2. Esfregaços sanguíneos .....	44
<b>4.5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....</b>	<b>44</b>
4.5.3.1. Extração e origem dos reagentes .....	44
4.5.3.2. Amplificação do DNA .....	44
<b>4.5.4. Eletroforese em gel de agarose .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.5. Sequenciamento nucleotídico.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.6. Provas sorológicas para <i>Toxoplasma gondii</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.6.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....</b>	<b>51</b>
4.5.6.1.1. Preparo do antígeno .....	51
4.5.6.1.2. RIFI.....	52
4.5.6.2. Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	52
4.5.6.2.1. Preparo de antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg).....	52
4.5.6.2.2. Ensaio imunoenzimático para anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	53
4.5.6.2.3. Avaliação da avidéz de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	55
<b>4.6. Análise de dados.....</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1. Características da população estudada.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Identificação de ectoparasitos.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3. Análise dos esfregaços sanguíneos.....</b>	<b>60</b>
<b>5.4. Diagnóstico molecular de hemopatógenos.....</b>	<b>61</b>
<b>5.5. Testes sorológicos para <i>Toxoplasma gondii</i> .....</b>	<b>68</b>
5.5.1. ELISA e RIFI para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em felinos.....	68
5.5.2. Frequência de felinos soropositivos para toxoplasmose de acordo com sexo e faixa etária.....	70
5.5.3. Comparação dos testes RIFI X ELISA .....	71
5.5.4. Avidéz de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	72
<b>5.6. Coinfecções e exposição a múltiplos patógenos.....</b>	<b>72</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Organização social do gato doméstico e impactos de sua superpopulação em ambientes urbanos

O gato doméstico (*Felis silvestris catus*) - Mammalia, Felidae - tem se tornado o animal de estimação mais comum na atualidade, como é o caso dos EUA (Estados Unidos da América) e de diversos países da União Europeia, nos quais o número de gatos atingiu aproximadamente 77,4 milhões em comparação aos 68,5 milhões de cães no ano de 2019 (STATISTA, 2020).

No Brasil, os cães ainda representam o animal de estimação mais popular, com 54,2 milhões, e gatos com uma população de 23,9 milhões. Porém, por se tratar de um animal pequeno, de fácil adaptação a ambientes menores, como apartamentos e que demonstram uma maior independência e menores despesas para sua manutenção, os gatos representaram o maior crescimento em aquisições pela população brasileira em 2018 (ABINPET, 2018).

Segundo a classificação proposta por Farnworth, Campbell & Adams (2011), os gatos podem ser agrupados em três categorias, de acordo com local, modo de vida e grau de dependência em relação ao ser humano, sendo elas: gatos domésticos, a qual inclui gatos domiciliados ou semi-domiciliados que estão sob a responsabilidade de seus tutores, os quais asseguram todas ou a maior parte de suas necessidades; gatos errantes que são definidos como animais que frequentam livremente áreas urbanas ou rurais e que ainda mantém um vínculo direto ou indireto com os seres humanos para o fornecimento de recursos (alimentos, abrigo, proteção), porém, não estão necessariamente sob a responsabilidade destes. Em algumas ocasiões, estes animais também podem ser chamados de comunitários. E por último, estão os gatos ferais caracterizados como gatos que vivem em seu estado selvagem e que não dependem de forma intencional dos humanos para suprir suas necessidades, sendo que a maior parte de sua alimentação é garantida através da caça ou pela procura por restos de alimentos.

Essa classificação pode ser dinâmica entre os indivíduos, já que ao longo da sua existência os gatos podem sofrer alterações em seu estilo de vida, como por exemplo, um gato anteriormente classificado como errante e que passou por um longo período em ambiente selvagem e por isso passa a se caracterizar como um gato feral (CENTONZE, 2002).

A prática do abandono na maioria das vezes impulsionada pela falta de conhecimento acerca do comportamento felino, ausência de uma cultura da posse responsável, assim como a

escassez ou ineficiência de políticas públicas consistentes de controle populacional animal podem ser apontadas como as principais causas pela existência de animais errantes e ferais, que somados aos gatos doméstico com acesso à rua, levam ao crescimento descontrolado da população felina, tanto em ambientes rurais como principalmente em áreas urbanas (LANDSBERG, 1996; GENARO, 2002).

O aumento dessa densidade populacional favorece o aparecimento das chamadas “colônias de gatos”, as quais podem ser definidas como um grupo de gatos que se fundem em torno de recursos oferecidos ou gerados pelo ser humano, como a presença de lixo e áreas de alimentação (LEPCZYK et al., 2015). São de uma forma geral, compostas de três ou mais gatos adultos, geralmente fêmeas, que defendem os recursos para sobrevivência e excluem fêmeas não relacionadas, e filhotes (SLATTER, 2005).

Apesar de poderem ser encontrados em diferentes tipos de habitats, como zonas rurais e áreas de mata, a permanência dos gatos em um local está fortemente associada com as áreas urbanas, principalmente devido a oferta de recursos alimentares disponíveis (AGUILAR & FARNWORTH, 2012). Dentro da zona urbana, gatos errantes podem ser encontrados nos mais diversos locais, como parques públicos, hospitais, escolas, zoológicos e outras instituições, sendo que são escassos os estudos acerca dos potenciais impactos da existência de gatos errantes ou ferais em áreas também frequentadas por humanos (TAETZSCH et al., 2018).

Diante de todo o contexto apresentado, sabe-se que os gatos domésticos podem albergar diversos patógenos que, além de prejudicarem sua própria saúde, como os retrovírus causadores da FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV (vírus da leucemia felina), muitos são de caráter zoonótico como a raiva, toxoplasmose e esporotricose (GERHOLD & JESSUP, 2013; TAETZSCH et al., 2018; LAPPIN et al., 2019).

Gatos não domiciliados (errantes e ferais) representam o maior risco na transmissão de patógenos para os seres humanos, uma vez que estes são privados de cuidados veterinários preventivos, como a vacinação e tratamentos com ectoparasiticidas (GERHOLD & JESSUP, 2013). Além disso, podem prejudicar a viabilidade da vida silvestre pela transmissão de patógenos que possam ser letais a algumas espécies e também devido à predação da fauna local (MEDINA et al., 2014).

O município de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais (MG), Brasil, apresenta um grande número de parques públicos. O mais antigo deles é o Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG), inaugurado em 1897. Este se localiza na região do hipercentro

da cidade e compreende uma área de 180.000 m<sup>2</sup>. Sua importância se dá pela presença de uma grande variedade de espécies da flora e fauna que podem ser encontradas no local e por receber um grande fluxo de visitantes (MARTINS et al., 2005; SOARES et al., 2012; PBH, 2020;).

Além da fauna silvestre, animais domésticos como os gatos podem ser encontrados com facilidade nas dependências do parque. A introdução destes animais se deu provavelmente devido ao abandono pela população (PBH, 2020) e que, devido à falta de ações de manejo, controle populacional e educação ambiental levou a um descontrole no número de gatos, sendo que recentemente, a existência de algumas colônias foi estabelecida (CARVALHO, 2018). A presença de colônias de gatos favorece a dinâmica da transmissão de patógenos, seja pelo trânsito entre os gatos de uma mesma colônia ou pela interação entre diferentes colônias (LEPCZYK et al., 2015).

Em relação a transmissão de patógenos entre gatos e o ser humano, esta pode ocorrer devido a interações diretas, como mordidas e arranhadura, ou indiretas, seja pela ingestão acidental de agentes patogênicos presentes no ambiente, como oocistos de *Toxoplasma gondii* liberados nas fezes de gatos infectados e que podem permanecer viáveis no solo por longos períodos, sendo uma importante fonte de infecção (LEPCZYK et al., 2015; TAETZSCH et al., 2018), bem como através de vetores como pulgas e carrapatos, com destaque para os hemopatógenos.

Embora os gatos domésticos possam ser expostos a estes ectoparasitos e aos patógenos que eles transmitem, o conhecimento sobre o papel dos gatos na epidemiologia ou ecologia de patógenos transmitidos por vetores ainda é limitado (PENNISI et al., 2015).

O aumento das populações de cães e gatos e sua coabitação com humanos tanto em áreas urbanas como rurais podem representar novas ameaças para a saúde humana, sendo que estes podem ser considerados como sentinelas em pesquisas que combinem o levantamento de ectoparasitos e a triagem de patógenos transmitidos por estes, podendo fornecer informações relevantes sobre a pressão de potenciais infecções para a população humana em determinada área (DANTAS-TORRES et al., 2012; BANETH, 2014; OTRANTO, 2018).

Na América Latina, estudos de campo publicados nas últimas duas décadas e que têm como foco as doenças transmitidas por vetores sugerem que, com exceção de *Bartonella* spp. e hemoplasmas, infecções por *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. possam ser subdiagnosticadas em felinos, porém melhorias nas áreas da vigilância e de diagnósticos que

levem a uma identificação criteriosa e confiável ainda são necessárias (ANDRÉ et al., 2017; RODRIGUEZ-MORALES et al., 2019).

## **1.2. O contexto do Parque Municipal Américo Renné Giannetti**

O PqMARG está localizado na região do hipercentro do município de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, Brasil, sendo considerada uma das áreas de maior aglomeração urbana do país. Foi inaugurado em 26 de setembro de 1897, sendo considerado a área verde mais antiga do município. Na época de sua inauguração, o parque possuía uma área de 600.000 m<sup>2</sup>, porém hoje, o local compreende uma área de 180.000 m<sup>2</sup>. É cercado por vias movimentadas como a Avenida Afonso Pena, Avenida Assis Chateaubriand, Avenida dos Andradas, Avenida Carandaí, Rua da Bahia e Alameda Ezequiel Dias (MARTINS et al., 2005; PBH, 2020) e se encontra próximo à chamada Área Hospitalar, já que hospitais de referência como o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Hospital João XXIII, Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte localizam-se nas redondezas.

Apresenta uma vegetação diversificada composta por espécies nativas e exóticas trazidas de diversos países na época de sua construção (SOARES et al., 2012) e é considerado um importante refúgio para a fauna, sendo que já foram catalogadas mais de 70 espécies de vertebrados, sendo as aves as de maior diversidade. Espécies de mamíferos silvestres como gambás (*Didelphis* sp.) e saguis (*Callithrix* sp.), répteis, anfíbios e peixes também são encontrados. Em relação aos invertebrados, o parque abriga aproximadamente 100 espécies de borboletas e mariposas (SOARES et al, 2012; PBH, 2020).

Em relação aos gatos domésticos, no trabalho de Carvalho (2018) estimou-se uma população de 149 indivíduos no ano de 2016 e de 228 em 2017. A autora considera que este aumento tenha se dado principalmente devido aos abandonos recorrentes pela população mesmo sendo uma prática considerada crime ambiental de acordo com Lei Ambiental Federal nº 9605/1998. O fornecimento de alimento aos animais pela população e protetores de animais, também é outro fator que favorece a permanência destes no local. A presença de alimentos pode levar a atração de roedores e outros animais sinantrópicos, como pombos, o que pode aumentar a presença de ectoparasitas nos gatos aumentando o risco de infecção por patógenos de importância tanto para a própria saúde do animal, como para os seres humanos. (LEPCZYK et al., 2015).

Atualmente o parque conta com parcerias com a Secretaria de Saúde de Belo Horizonte, ONGs (Organizações não-governamentais) de causa animal e a Promotoria do Meio Ambiente e outras instituições para a realização de ações de proteção, adoção responsável e controle da população felina, feito através da esterilização, sendo que foi preconizado a estratégia do TNR (*Trap-Neuter-Return*) ou CED (Capturar- Esterilizar- Devolver) (PBH, 2020).

O TNR consiste na captura dos animais, que são levados aos locais habilitados onde são realizadas esterilização destes por médicos veterinários. Os animais podem também receber vacinas, antiparasitários e tratamento de lesões que possam ser encontradas. Após a recuperação, os animais retornam ao seu local de origem, porém, existem programas que disponibilizam para doação geralmente os gatos mais dóceis e sociáveis (CENTONZE, 2002).

### **1.3. Ectoparasitos e hemopatógenos em felinos domésticos**

#### **1.3.1. Ectoparasitos**

Ectoparasitos como pulgas e carrapatos podem atuar como transmissores de patógenos de importância animal e zoonótica, sendo que animais em situação de rua estão mais suscetíveis a infestações por não receberem cuidados veterinários como um controle periódico através de ectoparasiticidas (STALLIVIERE et al., 2009; SALANT et al., 2014; THOMAS et al., 2016).

Além disso, infestações por ectoparasitos são causas comuns de dermatites parasitárias que podem causar desordens pruriginosas associadas a auto traumatismo e deixar o animal suscetível a infecções secundárias (KHUL, 1994). Em relação aos ácaros, espécies como *Otodectes cynotis* (causa de otopatias externas), *Notoedres cati* (sarna notoédrica) e *Lynxacarus radovskyi* são consideradas as de maior importância em gatos. Quanto aos piolhos, a espécie *Felicola subrostratus* é a mais comum em populações de gatos, e são considerados espécie-específicos. (BOWMAN, et al., 2009)

Se tratando de gatos domésticos, a maioria dos estudos focam primeiramente nas pulgas tanto pelo dano direto causado pela hematofagia, como anemia, deficiência de ferro em animais muito debilitados, quanto pelo fato de estarem envolvidas na transmissão de agentes importantes do ponto de vista da saúde humana como *Bartonella* spp. (doença da arranhadura do gato) e também de importância veterinária como *Mycoplasma* spp. hemotrópicos, (BOWMAN, 2009; LAPPIN et al., 2010).



Gatos não domiciliados podem representar uma fonte válida para estudos de prevalência de ectoparasitos, uma vez estes frequentam ambientes onde podem haver a associação de atividades humanas e presença de outros animais, como por exemplo os parques públicos (THOMAS et al., 2016).

As espécies de pulgas *Ctenocephalides felis felis* e *Ctenocephalides canis* são as mais comuns, apresentando distribuição cosmopolita e registros em toda América Latina. Ambas podem ser encontradas em uma mesma região geográfica, porém, a *C. felis felis* possui maior importância na transmissão de patógenos tanto em cães como em gatos (LINARDI & SANTOS, 2012).

Em relação ao carrapatos, no Brasil, a principal espécie que ocorre em animais de companhia e de maior importância em cães é o *Rhipicephalus sanguineus*, o qual não possui os gatos como hospedeiros preferenciais, sendo que esses funcionam geralmente como hospedeiros acidentais do artrópode (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Os relatos da infestação por essa espécie em gatos geralmente são esporádicos (FERREIRA et al., 2010; MENDES-DE ALMEIDA et al., 2011; BRAGA et al., 2017). Silva et al. (2007) registraram parasitismo por *Amblyomma triste* em um gato doméstico semi-domiciliado no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, estado no qual já houve registro desta espécie também em cães e animais silvestres.

Porém, para Thomas et al. (2016), a carga de carrapatos encontrada em gatos pode ser subestimada, pois estágios imaturos (larva ou ninfa) podem passar despercebidos durante a inspeção do animal pela dificuldade de serem visualizados. Outros fatores que podem ser levados em consideração é o hábito de higienização dos gatos que, ao se lambem, podem remover os ectoparasitos (SILVA et al., 2007).

### **1.3.2. Hemoprotozoários**

#### **1.3.2.1. Ordem Piroplasmida**

##### **1.3.2.1.1. *Cytauxzoon felis***

*Cytauxzoon felis* Kier, 1979 é um protozoário hemoparasito pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e responsável por causar a cytauxzoonose, doença infecciosa emergente em gatos domésticos sendo altamente patogênico para estes animais ao causar uma doença de curso agudo que pode levar à morte em poucos dias (ALMOSNY &

MASSARD, 2002; ZIEMAN et al., 2018). Todos os felídeos são suscetíveis à infecção, sendo que casos em animais não felinos ainda não foram reportados na literatura (SHERRILL & COHN, 2015).

Foi primeiramente descrito em gatos dos EUA por Wagner (1976), país onde a doença possui o maior número de casos, especialmente em estados do sudeste e região centro-sul. Como os mecanismos de transmissão do agente já são conhecidos no país, sabe-se que a espécie *Lynx rufus*, conhecido como “bobcat” é o principal reservatório natural do patógeno. Em um trabalho realizado em 2011 foi encontrada uma prevalência de 79% de *C. felis* em “bobcats” de vida livre do Missouri, EUA (SHOCK et al., 2011).

Porém, já foram relatados gatos domésticos que sobreviveram a infecção natural por este protozoário, nos quais se observou que a persistência do piroplasma nesses animais pode perdurar por meses, anos ou até o final de suas vidas (MEINKOTH et al., 2000). Estudos também já detectaram o protozoário através da PCR e em esfregaços sanguíneos de gatos considerados assintomáticos. Tal fato pode indicar que estes animais além de hospedeiros acidentais, também possam atuar como reservatórios acidentais do patógeno (HABER et al., 2007; BROWN et al., 2008).

A transmissão na América do Norte ocorre principalmente por carrapatos das espécies *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* (BLOUIN et al., 1984; REICHARD et al., 2009).

O carrapato vetor ingere eritrócitos infectados por merozoítos ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro reservatório natural. Após sofrer um processo de replicação sexual no intestino (gametogênese), o parasito migra para a glândula salivar do carrapato através da esporogonia, adquire a forma infectante de esporozoíto, o qual será inoculado em outro hospedeiro durante alimentação do vetor. Nos hospedeiros vertebrados, os esporozoítos irão infectar células mononucleares, especialmente macrófagos, onde irão sofrer replicação assexuada originando os esquizontes (fase esquizogênica). Estes adquirem dimensões tão grandes que são capazes de obstruir o lúmen dos vasos sanguíneos onde se encontram, principalmente aqueles presentes em órgãos como pulmões, baço e fígado, levando à trombose parasitária. Esta fase é a responsável por causar a maior parte dos sinais clínicos severos da doença como a falência múltipla dos órgãos e morte do animal em até três semanas (MEINKOTH & KOCAN, 2005; SNIDER et al., 2010; LLORET et al., 2015). Quando ocorre o rompimento dos esquizontes, há liberação de um grande número de merozoítos na

circulação, os quais infectam eritrócitos e células mononucleares adicionais, causando um quadro de anemia hemolítica (LLORET et al., 2015).

Casos de infecção por outras espécies de *Cytauxzoon* também já foram descritos em um lince iberiano (*Lynx pardinus*) e gatos domésticos na Espanha (MILLÁN et al., 2007) e em gatos domésticos na Itália (CARLI et al., 2012).

No Brasil, em 2007, houve o primeiro relato de infecção fatal por *Cytauxzoon* sp. em um leão (*Panthera leo*) mantido em um zoológico no estado do Rio de Janeiro confirmado através de histopatologia e microscopia eletrônica. Uma onça pintada (*Panthera onca*) e um gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) pertencentes ao mesmo zoológico foram detectados por PCR e a análise molecular para fragmento do gene 18S rRNA mostrou 99% de similaridade com *Cytauxzoon felis* (PEIXOTO et al., 2007). A detecção de DNA de *Cytauxzoon* sp em outros felídeos selvagens de cativeiro assintomáticos também já foram relatados no país (ANDRÉ et al., 2009).

Em gatos domésticos, o primeiro relato de infecção natural pelo agente foi feito por Maia et al. (2013) no município de Areal, RJ. Até o momento não se sabe qual vetor pode ser o responsável pela transmissão no país, já que os carrapatos sabidamente vetores não se encontram em território brasileiro. Com isso, fica clara a necessidade de mais estudos que possam trazer evidências mais concretas acerca de potenciais vetores e reservatórios naturais de *C. felis* entre felinos selvagens e domésticos e dessa forma ajudar a elucidar a epidemiologia da doença no país (ANDRÉ et al., 2009).

#### **1.3.2.1.2. Babesia**

Espécies de *Babesia* são parasitos apicomplexos, também pertencentes à ordem Piroplasmida, transmitidos por carrapatos e capazes infectar uma enorme variedade de hospedeiros incluindo mamíferos e aves, sendo que seres humanos são considerados hospedeiros acidentais. São protozoários exclusivamente intraeritrocitários, uma das características que as distinguem do *Cytauxzoon*. Morfologicamente, a fase de trofozoíto, além de merozoítos de pequenas babesias são indistinguíveis da forma intraeritrocítica de *Cytauxzoon felis* (MEINKOTH & KOCAN, 2005; UILENBERG, 2006).

São mantidas em circulação em determinado ambiente através de um sistema complexo no qual são envolvidos os vetores e reservatórios animais e, apesar de ainda não se ter estabelecido o ciclo de vida completo para várias espécies de *Babesia*, os carrapatos da

família Ixodidae são os únicos vetores conhecidos. Mesmo para espécies com o ciclo de vida conhecido, ainda existem diversas lacunas relacionadas a possíveis vetores ou hospedeiros alternativos, proteção cruzada entre infecções subsequentes com a mesma espécie ou por espécies intimamente relacionadas, capacidade dos carrapatos de servirem como reservatórios na ausência de hospedeiros vertebrados e a duração da infecciosidade da *Babesia* em carrapatos vetores (YABSLEY & SHOCK, 2013).

A babesiose pode ser causada por diferentes espécies de *Babesia* sendo uma doença de distribuição mundial caracterizada pela destruição de eritrócitos e quadros de anemia. Em geral, a babesiose felina é uma infecção clínica mais rara em comparação com a canina, visto que informações sobre manifestações clínicas ainda são escassas, além de diversificadas, com a maiores dos sinais clínicos sendo inespecíficos (SOLANO-GALLEG0 & BANETH, 2011).

Casos clínicos de babesiose em gatos domésticos têm sido relatados mais frequentemente na África do Sul, onde a infecção é causada principalmente por *Babesia felis*, uma pequena babesia que causa anemia e icterícia e pode acometer também felinos silvestres (PENZHORN et al., 2004). Também na África do Sul, dois gatos foram diagnosticados com *Babesia lengau*, a qual se associou o quadro de babesiose cerebral e hemolítica que os animais apresentavam (BOSMAN et al., 2013). Em 2019, os mesmos autores relataram infecção por uma provável nova espécie de *Babesia* em gatos, com sintomatologia compatível à babesiose (BOSMAN et al., 2019). Relatos esporádicos em outros países também já ocorreram. Em Israel, houve a descrição de uma grande *Babesia* a qual sugere-se que seja uma subespécie da *Babesia canis* e foi nomeada como *Babesia canis presentii* (BANETH et al., 2004). Na Tailândia, gatos errantes foram detectados com *Babesia* sp. com similaridade para *Babesia vogeli* (SIMKING et al., 2010).

No Brasil, a *B. vogeli* é o principal agente etiológico da babesiose canina. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato é o vetor desse hemoprotozoário no país (PASSOS et al., 2005). Apesar dos poucos relatos de babesiose felina no Brasil, André et al., (2014) detectaram, pela primeira vez em gatos domésticos presentes em um zoológico, amostras positivas para *Babesia* sp. com DNA similar a *B. vogeli*. Outro relato semelhante foi descrito na região sul do país (MALHEIROS et al., 2016). Ainda não se conhece no Brasil potenciais vetores responsáveis pela transmissão de *Babesia* spp. em gatos (ANDRÉ et al., 2014).

### 1.3.2.2. *Trypanosoma evansi*

*Trypanosoma evansi* é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. É um dos agentes da tripanossomose, uma doença com ampla distribuição na África, Ásia e América Latina (BRUN et al., 1998). Apresenta uma ampla diversidade de hospedeiros suscetíveis à infecção, fato que levanta hipóteses sobre o potencial zoonótico deste protozoário (MISRA et al., 2016).

Os efeitos da infecção por *T. evansi* podem ser variáveis e dependem principalmente do hospedeiro envolvido e da área geográfica, o que faz com que a tripanossomose, além de ser uma doença multiespécie, também seja polimórfica. (DESQUESNES et al., 2013)

A principal forma de transmissão ocorre mecanicamente através da picada de dípteros hematófagos (tabanídeos e *Stomoxys*). A transmissão por via oral também pode ocorrer, sendo um mecanismo importante para animais carnívoros, já que estes podem adquirir *T. evansi* ao se alimentarem de presas infectadas. Cães e gatos que vivem em fazendas ou proximidade com matadouros podem contrair o protozoário ao ingerir carne, sangue ou vísceras provenientes de animais infectados abatidos (DESQUESNESS et al., 2013).

Morcegos hematófagos foram reconhecidos como vetores biológicos de *T. evansi*, sendo uma importante forma de transmissão na América Latina. Estes quirópteros podem adquirir a infecção por via oral ao se alimentarem em outros vertebrados (mais comumente cavalos e bovinos) contaminados. Os indivíduos que não sucumbem à infecção passam a ter o protozoário se multiplicando na corrente sanguínea, sendo que estes podem também ser encontrados na saliva de morcegos cronicamente infectados. Assim, esses animais podem transmitir o agente para outros morcegos da colônia através de mordidas, o que torna estes animais além de vetores biológicos, hospedeiros reservatórios de *T. evansi* (HOARE, 1965; DESQUESNES, 2004).

No Brasil, a região do Pantanal é uma área endêmica para *T. evansi*, infectando principalmente equinos, causando doença conhecida como “Mal das Cadeiras” ou “Surra” devido a sua sintomatologia nervosa caracterizada pela paresia de membros posteriores. Animais silvestres, como quatis (*Nasua nasua*) e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são considerados reservatórios (HERRERA et al, 2004).

Em Minas Gerais, no Parque Municipal das Mangabeiras, localizado na cidade de Belo Horizonte, quatis já foram detectados como portadores de *T. evansi* (ESTEVAM et al.,

2020) e mesmo o estado não sendo endêmico para o agente, equinos também já foram encontrados infectados (NUNES et al., 2012)

Apesar de animais domésticos como cães e gatos poderem ser suscetíveis à infecção, pouco se sabe sobre o papel que estes possam desempenhar na epidemiologia do *T. evansi*. Segundo Desquesness (2004), cães poderiam atuar como animais sentinelas e / ou reservatório peridoméstico para *T. evansi*.

Em gatos, relatos de infecção natural por *T. evansi* são extremamente raros, sendo que a maioria dos estudos são trabalhos experimentais e levantamentos sorológicos (CHOUDHURY et al., 1972; DA SILVA et al., 2010; MATOS et al., 2018). Segundo Raina et al., (1985), a transmissão em gatos pode até ser mais recorrente devido ao hábito mais aguçado de caça desses animais (transmissão oral), além da transmissão clássica através da picada de moscas hematófagas. Tarello (2005) identificou, em lâminas de esfregaço de sangue de três gatos, tripomastigotas morfológicamente sugestivas de *T. evansi*, porém, tal resultado não foi confirmado por outras técnicas mais sensíveis, como a biologia molecular.

### **1.3.3. Bactérias**

#### **1.3.3.1. Micoplasmas hemotrópicos**

Micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são bactérias que acometem os eritrócitos. De formato arredondado a alongado, estas se aderem, sem penetrar, na superfície das células vermelhas do sangue, sendo agentes causadores de anemia infecciosa em diversas espécies de mamíferos (CONRADO et al., 2015) inclusive em gatos, levando a quadros de anemia hemolítica, conhecida também como anemia infecciosa felina (TASKER, 2010; BARKER, 2019).

Antigamente, as espécies de micoplasmas hemotrópicos eram classificadas junto às riquetsias, dentro da família Anaplasmataceae incluindo *Haemobartonella felis* (reclassificada como *Mycoplasma haemofelis*) e também espécies do gênero *Eperythrozoon*, porém, suspeitava-se de que estas estavam mais relacionadas aos membros da classe Mollicutes ao se basearem em características fenotípicas como a falta de parasitismo intracelular, tamanho reduzido, falta de parede celular, resistência à penicilina e seus análogos e suscetibilidade a tetraciclina (MESSICK, 2004), além da suspeita da transmissão através de artrópodes e inabilidade para crescimento *in vitro* (WILLI et al., 2010).

Atualmente, após estudos de análise molecular, estas bactérias foram reclassificadas como pertencente à família Mycoplasmaceae (RIKIHISA et al, 1997). As principais espécies que acometem felinos são *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (CMhm) e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (CMt), sendo a primeira conhecida por ser a mais patogênica e responsável pelos quadros de anemia hemolítica. Além destas, já houve relatos de gatos infectados por uma espécie similar a um hemoplasma canino, denominado ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, o que leva a sugerir que felinos podem ser acometidos por diversas espécies (SYKES et al., 2007).

Acredita-se que a transmissão ocorra através de ectoparasitos, sendo que as pulgas são as principais incriminadas, principalmente a espécie *C. felis*, porém, a transmissão horizontal por contato direto também pode ocorrer. De acordo com Tasker, (2010), prevalências elevadas de micoplasmas felinos são comumente relatadas em gatos machos adultos com acesso à rua, sendo estas variáveis apontadas como de risco, pois, por serem animais territorialistas há maior oportunidade desses animais se envolverem em brigas intraespecíficas, levando o animal a se infectar através do contato direto devido às lesões causadas por mordidas e arranhões. Transmissão via transfusão sanguínea já foi reportada (WILLI et al., 2006) assim como a transmissão vertical da mãe aos filhotes via transplacentária ou através da lactação (TASKER, 2010).

Outros mecanismos de transmissão também vêm sendo investigados, como através da hematofagia de mosquitos do gênero *Aedes*, porém os resultados obtidos não são suficientes para sugerir que possa ocorrer transmissão biológica através desse modelo (REAGAN et al., 2017).

Todas as três espécies já foram descritas em todo o mundo, seja como infecções isoladas ou concomitantes, e com prevalências variáveis de acordo com a região geográfica (BARKER, 2019). Na maioria dos estudos de prevalência, a espécie CMhm tem sido a mais encontrada em trabalhos nos EUA, Europa (WILLI et al., 2006; SYKES et al., 2008; SILAGHI et al., 2014) e também no Brasil (SANTOS, 2008; BRAGA et al., 2012; ANDRÉ et al., 2014; AQUINO et al., 2014)

A patogenicidade da doença pode variar entre as espécies e, mesmo dentro das espécies, pode variar entre as cepas (TASKER, 2010; BARKER, 2019). Apesar da Mhf ser considerada a mais patogênica para felinos, já foi relatado que a coinfeção entre CMhm e Mhf e também a presença de FIV ou FeLV podem agravar os sinais clínicos (WESTFALL et al., 2001; GEORGE et al., 2002)

Gatos que sobrevivem à fase aguda da doença podem se tornar portadores crônicos. Esta condição pode se estender por toda a vida do animal, porém, em alguns indivíduos, após tratamento com antibióticos ou até mesmo de forma espontânea, há eliminação do patógeno, resultando em uma aparente eliminação da infecção (TASKER, 2010).

Por serem microrganismos fastidiosos, as tentativas de cultivo *in vitro* destes patógenos nunca obteve sucesso (BIONDO et al., 2009), por isso, as técnicas moleculares PCR vem sendo empregadas com bastante sucesso na identificação de animais infectados (MESSICK, 2004).

O diagnóstico citológico apresenta baixa sensibilidade, já que precipitados de corante, corpúsculo de Howell-Jolly e artefatos podem ser facilmente confundidos gerando resultados falso-positivos. Além disso, a presença de anticoagulantes como EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e heparina tem sido apontados por causar o desprendimento do hemoplasma dos eritrócitos com o passar do tempo (TASKER et al., 2003; TASKER, 2010).

Do ponto de vista zoonótico, embora acredite-se que a maioria das espécies de *Mycoplasma* sejam espécie- específicas, já foi relatado no Brasil a infecção por *M. haemofelis* em um paciente humano HIV positivo (DOS SANTOS et al., 2008).

### **1.3.3.2. Família Anaplasmataceae**

Espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* são bactérias coccóides intracelulares obrigatórias pertencentes à família Anaplasmataceae e ordem Rickettsiales e estão entre os agentes transmitidos por vetores mais importantes por serem capazes de infectar uma grande variedade de animais domésticos e selvagens e também o ser humano por todo o mundo (ALLISON & LITTLE, 2013). São organismos intravacuolares pleomórficos que se replicam em células hematopoiéticas e podem se apresentar como inclusões citoplasmáticas em diferentes formas: corpos elementares (0.2- 0.4 µm de diâmetro), corpos reticulares e mórulas (acima de 2- 6µm de diâmetro) (PENNISI et al., 2017).

Todos os patógenos riquetsiais necessitam de um vetor para que seja mantida a transmissão no ambiente assim como a infecção de novos hospedeiros. Carrapatos são apontados como os vetores mais comuns e importantes, embora transmissão através de transfusões sanguíneas e por fômites contaminados com sangue de indivíduos infectados também já foram relatados (LITTLE, 2010; ALLISON & LITTLE, 2013).



### 1.3.3.2.1. *Ehrlichia* spp.

As espécies de *Ehrlichia* como *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* realizam sua multiplicação em células como monócitos, macrófagos e linfócitos, enquanto que a *Ehrlichia ewingii* acomete neutrófilos e eosinófilos (ALLISON & LITTLE, 2013).

Embora já descritas em outras regiões (NDIP et al., 2005; YU et al., 2008), *E. chaffeensis* possui maior importância no sul e leste dos EUA, assim como a *E. ewingii*, e na Califórnia. Nessas regiões *E. chaffeensis*, além de infectar cães, é a responsável por causar a Ehrliquiose Monocítica Humana (EMH). Possui como vetor primário *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* em menor grau, embora também existam relatos de que *R. sanguineus* poderia ser secundário na transmissão desta e também de *E. ewingii*, a qual também é transmitida primariamente pelo *A. americanum* (GUTIERREZ et al., 2008; NDIP et al., 2010). Em locais de ocorrência da doença, o cervo-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) tem sido incriminado como o principal reservatório da bactéria no ambiente (YABSLEY et al., 2002). No Brasil, já foi relatado em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) infecção por *E. chaffeensis* (MACHADO, 2006), assim como em um veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (SILVEIRA et al., 2012).

*Ehrlichia ewingii* é responsável por causar a Ehrliquiose Granulocitotrófica Canina (EGC) e já foi relatada em seres humanos os quais, assim como os cães, são apontados como hospedeiros acidentais. Da mesma forma que *E. chaffeensis*, o cervo-da-cauda-branca também é considerado seu hospedeiro reservatório (COCAYNE & COHN, 2015).

No Brasil a principal espécie é *E. canis*, que apresenta distribuição cosmopolita e é a principal envolvida nos casos de Ehrliquiose Monocítica Canina (EMC). A transmissão ocorre principalmente pelo *R. sanguineus* (MACIEIRA et al., 2005; COSTA JÚNIOR et al., 2007).

Os cães são considerados os principais reservatórios e os estágios imaturos do carrapato se infectam ao se alimentarem em um cão em ricketsemia, sendo que estes permanecem infectados por todo seu ciclo de vida devido a transmissão transtadial (LITTLE, 2010).

A variedade de *Ehrlichia* spp., que infecta cães, juntamente com as variações documentadas em relação à patogenicidade de diferentes cepas de *E. canis*, resulta em um amplo espectro de manifestações da doença que pode variar de clinicamente inaparente a grave, sendo que os animais podem desenvolver forma aguda ou crônica da doença. Tal

quadro pode ainda ser influenciado por fatores inerentes aos animais, como raça, idade, sexo, resposta imunológica, infecções preexistentes e também pela quantidade de patógeno inoculado durante a alimentação do carrapato (NEER et al., 2006). Os sinais clínicos mais frequentes são febre, letargia, anorexia podendo ser acompanhados de esplenomegalia, linfadenopatia, hemorragias, lesões oculares e mialgia (LITTLE, 2010).

Do ponto de vista de saúde pública, Perez et al. (2006), detectaram DNA de *E. canis* em seis pacientes humanos na Venezuela que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a doença. No Brasil, Diniz et al., (2007) detectaram em cães naturalmente infectados, uma cepa de *E. canis* geneticamente idêntica àquela encontrada nos pacientes humanos na Venezuela, destacando o potencial zoonótico desta espécie.

Em felinos existem alguns relatos de detecção molecular de DNA *Ehrlichia* sp. com alta similaridade genética com *E. canis* (BREITSCHWERDT, et al., 2002; BRAGA et al., 2012; ANDRÉ et al., 2015; MAIA et al., 2015) apesar de dados sobre a patogenia, assim como de potenciais formas de transmissão e epidemiologia da infecção, ainda sejam escassos nesses animais (PENNISI et al., 2017).

#### **1.3.3.2.2. *Anaplasma* spp.**

As principais representantes deste gênero de importância para carnívoros são as espécies *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum*.

*Anaplasma platys* se replica em plaquetas maduras e é o agente da Anaplasmosse Trombocitotrófica também conhecida como Trombocitopenia Cíclica Canina, a qual é comumente relatada em cães de todo o mundo (DUMLER et al., 2001; SAINZ et al., 2015).

Acredita-se que a transmissão ocorra por meio de carrapatos *R. sanguineus*, já que o agente é mais frequentemente identificado em áreas onde a *E. canis* é comum em cães, como no sul dos EUA e, Snellgroove et al. (2020) conseguiram demonstrar a capacidade de *R. sanguineus* sensu stricto na transmissão do agente. A doença causada somente pela infecção por *A. platys* é apontada por ser relativamente branda, mas a coinfeção com outros agentes, incluindo *E. canis*, pode resultar em sinais clínicos mais graves (HARVEY, 2006; GAUNT et al., 2010). Em gatos domésticos, a infecção por *A. platys* tem sido reportada mesmo de forma esporádica (SALAKIJ et al., 2012; QUROLLO et al., 2014; ZOBBA et al., 2015).

No Brasil, Santarém et al., (2005) relataram pela primeira vez a presença de inclusões plaquetária semelhantes a mórulas de *A. platys* em um gato domiciliado que apresentava

quadro clínico de anemia normocítica normocrômica. A primeira descrição da detecção molecular da espécie em um gato domiciliado naturalmente infectado ocorreu no estado de Pernambuco (LIMA et al., 2010) e o relato de gatos infectados pelo patógeno, mas que não apresentavam alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, levou a hipótese de que estes animais poderiam atuar como potenciais reservatórios assintomáticos (CORREA et al., 2011). Em outro levantamento mais recente, também foi detectado de forma molecular, gatos positivos para o agente (PINTO et al., 2018).

O relato da detecção por PCR da bactéria em dois seres humanos com histórico de exposição prévia ao *R. sanguineus* na Venezuela e a visualização de inclusões plaquetária basofílicas em plaquetas durante exame de hematoscópio levam a sugerir o potencial zoonótico da *A. platys* (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014).

*Anaplasma phagocytophilum* tem preferência pelos neutrófilos e eosinófilos e é o agente da Anaplasmoose Granulocítica em animais e humanos. Possui maior importância no hemisfério norte uma vez que sua ocorrência está associada à presença dos principais vetores que são os carrapatos do complexo *Ixodes persulcatus* (*Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus* e *Ixodes ricinus*) (LITTLE, 2010). Pequenos mamíferos, como roedores e o cervo-da-cauda-branca, são considerados os principais reservatórios. Em cães, a doença está associada a trombocitopenia, linfopenia e anemia discreta (DINIZ & BREITSCHWERDT, 2015).

Em relação à infecção em seres humanos, casos são relatados nos EUA e em países da Europa e da Ásia também foram confirmados (DINIZ & BREITSCHWERDT, 2015). A doença aparentemente parece ter curso auto-limitante e os sintomas podem compreender febre, mal-estar, cefaleia e mialgia e alterações como trombocitopenia discreta também podem ser encontradas. Além disso, variantes genéticas de *A. phagocytophilum* não associadas a doenças já foram descritas (COURTNEY et al., 2004).

No Brasil, *A. phagocytophilum* já foi descrito em carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *R. sanguineus* coletados de cães domésticos (SANTOS et al., 2013). Silveira et al., (2015) relataram um caso de coinfeção por *A. phagocytophilum* e *E. canis* em um cão que possuía histórico de parasitismo recente por *R. sanguineus* em Belo Horizonte, MG, região considerada endêmica para esta espécie de carrapato. Outros relatos de detecção molecular para *A. phagocytophilum* em outros cães já foram descritos na mesma localidade (SILVEIRA et al., 2017).

A suscetibilidade de gatos ao agente foi descrita através de um estudo experimental e inquéritos sorológicos geralmente detectam gatos domésticos positivos em regiões endêmicas

para o *Ixodes* spp (LAPPIN & BREITSCHWERDT, 2015). No Brasil, genótipos intimamente relacionados para *A. phagocytophilum* já foram relatados em gatos domésticos e felinos selvagens de cativeiro (ANDRÉ et al., 2012; ANDRÉ et al., 2014; PINTO et al., 2018).

#### **1.4. *Toxoplasma gondii***

##### **1.4.1. Biologia e Transmissão**

*Toxoplasma gondii* é um dos parasitos mais estudados em todo mundo devido a sua importância médica e veterinária. É parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e ordem Eucoccidiiida. Possui distribuição mundial, sendo que todos os animais homeotérmicos incluindo os seres humanos podem se comportar como hospedeiros intermediário (HILL et al., 2005).

Animais da família Felidae, como os felinos silvestres e domésticos, têm grande importância no ciclo de vida deste parasito, devido ao fato de serem os únicos capazes de se comportarem como hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2004).

São conhecidas três formas infectantes do *T. gondii*: esporozoítos (em oocistos), bradizoítos (em cistos teciduais) e taquizoítos (HILL et al., 2005). As duas principais rotas de transmissão do *T. gondii* compreendem a ingestão de alimentos (frutas e hortaliças) e água contaminados pelos oocistos que são eliminados nas fezes de felinos, ou pela ingestão de cistos teciduais viáveis encontrados em carnes cruas ou malcozidas (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013). A principal fonte de contaminação nos grandes surtos de toxoplasmose descritos na literatura em seres humanos é a água contaminada com fezes de felinos (MOURA et al., 2006; MINUZZI et al., 2020).

É no intestino dos felinos que a reprodução sexuada do parasito acontece levando à formação dos oocistos, os quais são eliminados ainda não esporulados. Após a eliminação no ambiente, e este apresentando condições favoráveis de temperatura, umidade e oxigenação, levarão a esporulação dos oocistos que irão adquirir sua forma infectante. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos, com quatro esporozoítos em seu interior (ARAMINI et al., 1999).

Tendo a transmissão ocorrido no hospedeiro intermediário pela ingestão acidental de oocistos ou por cistos teciduais, a parede externa dessas estruturas é rompida através da ação enzimática e as formas infectantes de bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, são liberadas no lúmen intestinal e em seguida atingem as células do hospedeiro de forma

sistêmica e passam a se diferenciar assexuadamente em taquizoítos, que são conhecidos como formas de multiplicação rápida do parasito. Esse período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da doença. A ação do sistema imune faz com que a multiplicação dos taquizoítos seja interrompida e é a partir daí que são formados os cistos teciduais contendo as formas de bradizoítos, conhecidos como formas de replicação lenta do parasito e a infecção atinge sua fase crônica. Os cistos teciduais possuem predileção pela musculatura esquelética, cardíaca, sistema nervoso central e tecido ocular. A transmissão por outras vias como transplantes de órgãos, ingestão de leite cru e acidentes em laboratórios também já foram reportadas (TENTER et al., 2000; GROSS et al., 2004).

Geralmente a doença é assintomática, porém, tem grande importância para mulheres gestantes, pois pode causar diversas sequelas ao feto devido a transmissão de taquizoítos pela via transplacentária, e para pessoas imunocomprometidas, determinando manifestações neurológicas (DUBEY, 2010).

Solos contaminados por ovos de helmintos ou cistos/oocistos de protozoários são reconhecidas como importantes fontes de infecção para animais e humanos (TORGERSON & MACPHERSON, 2011). Tomando como exemplo os oocistos de *T. gondii*, apesar dos gatos realizarem a eliminação dos oocistos por um curto período de tempo (7 a 20 dias), estes podem permanecer viáveis no solo ou na água por longos períodos, caso as condições ambientais sejam adequadas (DABRITZ et al., 2007; SIMON et al., 2017).

Foi observado que gatos domésticos que vivem socialmente em grupos usualmente defecam nas chamadas “latrinas”, ou seja, áreas que foram estabelecidas pelos próprios animais para realizarem a deposição de suas fezes, o que leva a uma grande concentração de oocistos nestes locais e, portanto, a um maior risco de infecções para animais e humanos (CORBETT, 1983).

Diversos estudos em áreas urbanas demonstraram que locais considerados comuns para defecção de gatos como parques, jardins, caixas de areia, parques infantis e áreas próximas a depósitos de lixo, são frequentemente contaminados com oocisto de *T. gondii* (LASS et al., 2009; DU et al., 2012).

#### **1.4.2. Toxoplasmose felina**

Em geral, a maioria das infecções por *T. gondii* em gatos ocorre no período pós-natal, sendo que o aumento da soropositividade de acordo com a idade do animal é a principal evidência disto. Os anticorpos transferidos maternalmente começam a decair a partir da 12<sup>a</sup>

semana de vida do gato, o que explicaria o fato de que anticorpos anti- *T. gondii* são detectados na maioria dos gatos jovens após o desmame, que acontece geralmente da 6<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> semana (DUBEY, 2010).

A contaminação de felinos ocorre, na maioria das vezes, pela ingestão de cistos teciduais e a transmissão por oocistos parece ser improvável (DUBEY, 2006). A transmissão congênita, apesar de rara, também pode acontecer (ELMORE et al., 2010).

A infecção em gatos geralmente é assintomática. Gatos infectados congenitamente são mais suscetíveis a apresentarem sinais clínicos, assim como gatos adultos que apresentam infecções concomitantes (vírus da imunodeficiência felina - FIV; vírus da leucemia felina - FeLV) e/ou condições imunossupressoras, sendo que casos de pneumonite fatal, anorexia, vômitos, paresia, sinais neurológicos, uveíte, diarreia já foram relatados em gatos soropositivos para *T. gondii* (VOLLAIRE et al., 2005; DUBEY et al., 2020).

Embora acredita-se que a maioria dos gatos elimine oocistos uma vez na vida, estudos de infecção experimental já demonstraram que a re-excreção de oocistos pode ocorrer após aplicado um protocolo imunossupressivo (MALMASI et al., 2009). Porém, mesmo que haja a possibilidade, ainda não existem dados que confirmem que ocorra re-excreção de oocistos em gatos naturalmente infectados (DUBEY, 2010). Coinfecções experimentais com *Cystoisospora felis* podem alterar a resposta imune e permitir a re-excreção de oocistos de *T. gondii* em gatos na fase crônica da toxoplasmose (DUBEY et al., 2020).

Apesar da soroprevalência para *T. gondii* em gatos domésticos em todo o mundo ser estimada em 30- 40%, além da região geográfica, outros fatores podem influenciar nas taxas soropositividade, entre eles o estilo de vida do gato e até mesmo uma área específica dentro de um município, e por isso não devem ser generalizadas (DUBEY, 2010). Estudos com gatos ferais e não domiciliados, por exemplo, podem apresentar maiores soroprevalências devido ao hábito de caça desses animais em relação à trabalhos com gatos domiciliados (AFONSO et al. 2006; DUBEY, 2010).

No Brasil, a diversidade entre as taxas de soroprevalência também foram reportadas. No Maranhão, amostras de gatos domiciliados com acesso à rua apresentaram uma alta soroprevalência (50,5%) (BRAGA et al., 2012). Em Fernando de Noronha, a soroprevalência em gatos errantes foi de 59,3% (COSTA et al., 2012). Porém, em São Paulo e Rio de Janeiro, estudos realizados com gatos errantes ou de abrigos, apresentaram resultados de soroprevalência consideradas baixas, variando entre 15,7% a 20,3% (COELHO et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; CARDIA et al., 2013; BOLAIS et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido ao fato do PqMARG receber um grande contingente de visitantes que utilizam o local como forma de lazer, principalmente pela sua localização, centralizada em uma das maiores aglomerações urbanas da capital Belo Horizonte, MG, o estudo sobre a condição sanitária das colônias de gatos existentes no local através do levantamento de patógenos que possam configurar em problemas tanto para o animal como também para seres humanos, pode representar o primeiro passo para o entendimento da dimensão e representividade dos achados laboratoriais em relação aos potenciais riscos à saúde coletiva.

Assim, esses animais podem servir como indicadores sentinelas para a circulação de patógenos, especialmente aqueles transmitidos por vetores, uma vez que pouco se sabe sobre as espécies de hemopatógenos circulantes nesses felinos, principalmente do ponto de vista do significado epidemiológico destes animais no ciclo de transmissão destes agentes.

Em relação ao *Toxoplasma gondii*, o grande sucesso da viabilidade dos oocistos no solo e na água representa uma importante fonte de infecção para outros animais e seres humanos, sendo que o monitoramento da ocorrência da toxoplasmose felina, principalmente através de estudos de soroprevalência em locais como parques públicos onde há a coexistência desses animais, fauna silvestre e ser humano, são importantes para elucidar sobre a dinâmica do ciclo da parasitose em determinado ambiente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Detectar hemopatógenos transmitidos por vetores em amostras de sangue e definir a soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos comunitários do Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG) coletadas nos anos de 2015 a 2018

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Identificar os ectoparasitos coletados;
- Pesquisar hemopatógenos em lâminas de esfregaços de sangue;
- Realizar a triagem através de métodos moleculares para pesquisa de hemoprotozoários da ordem Piroplasmida e bactérias da família Anaplasmataceae e do gênero *Mycoplasma* em amostras de DNA de sangue;
- Detectar molecularmente, hemoprotozoários das espécies *Cytauxzoon felis*, *Trypanosoma evansi* e bactérias das espécies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ em amostras de DNA de sangue.
- Determinar a soroprevalência da infecção por *T. gondii* em amostras de soros de gatos através da RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*);
- Verificar a concordância entre as técnicas de RIFI e ELISA;
- Determinar a avidéz de anticorpos da classe IgG anti- *T. gondii* em amostras sorológicas reagentes no ELISA;
- Determinar a frequência e verificar existência de associação entre os resultados qualitativos dos testes diagnósticos realizados de acordo com as variáveis nos gatos do PqMARG.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho encontra-se inserido no projeto "Manejo de gatos comunitários no município de Belo Horizonte, Minas Gerais", iniciado em 2016 em parceria com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Belo Horizonte (PBH) e a UFMG. O projeto está aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo nº 185/2016 (Anexo 1) e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) cadastro AAD865B.

Este trabalho foi realizado junto à execução das ações de vigilância da raiva nos limites do PqMARG) em um projeto já vigente no município de Belo Horizonte desde 2014 denominado "Ações de vigilância e controle da raiva no Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte", coordenado pela Gerência de Controle de Zoonoses (GERCZO) da Secretaria Municipal da Saúde (SMSA) da PBH, o qual prevê o controle populacional de cães e gatos errantes através da estratégia do tipo TNR.

O termo de parceria entre a UFMG e Secretaria Municipal de Saúde/ Gerência de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte pode ser consultado no Anexo 2.

### **4.1. Tipo de estudo**

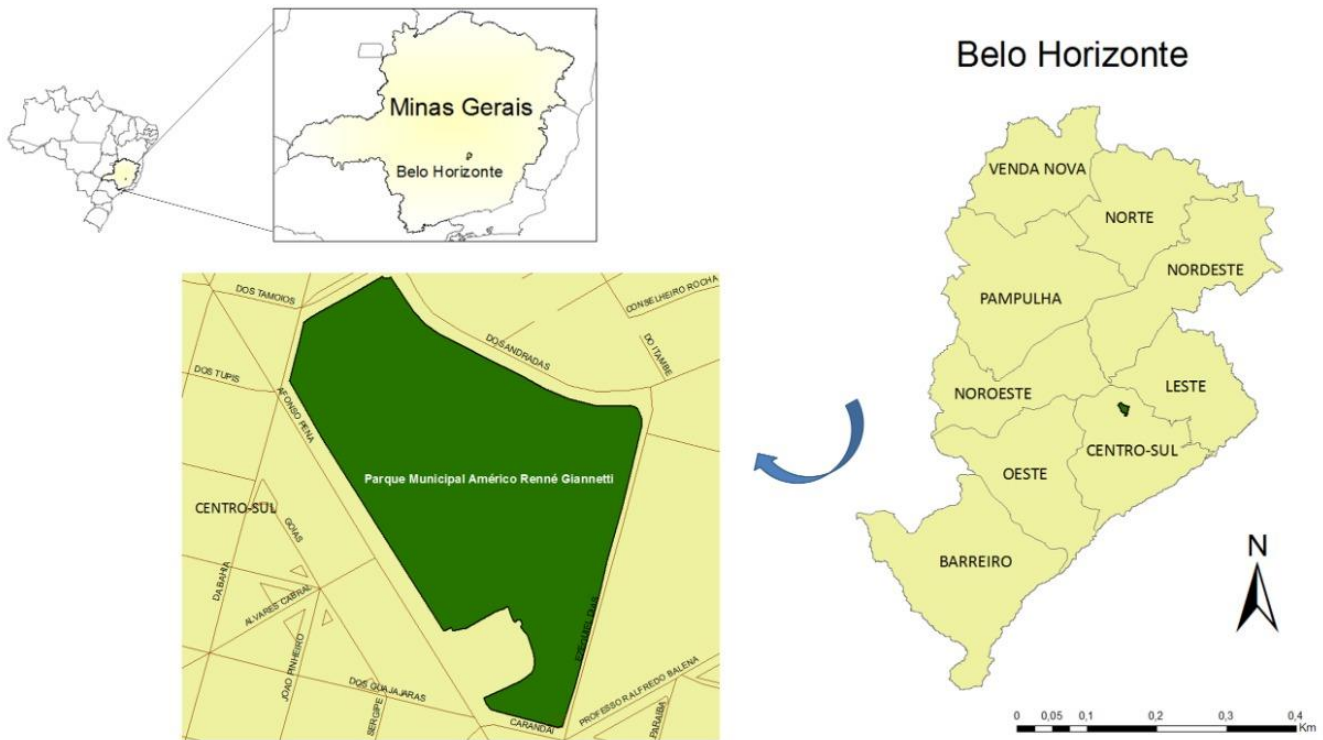
Trata-se de um estudo do tipo epidemiológico transversal analítico realizado através da análise de um banco de amostras biológicas coletadas (ectoparasitos, esfregaços sanguíneos, sangue e soro) dos gatos comunitários do PqMARG capturados durante o período de dezembro de 2015 a janeiro de 2018, considerando dados da população amostrada como sexo, faixa etária, local de captura e presença de ectoparasitos.

### **4.2. Área do estudo**

O Parque Municipal Américo Renné Giannetti está localizado na região centro-sul da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (S 19°55'37" W 43°56'42") (Figura 1), a qual é considerada a de maior adensamento populacional do município (PBH, 2020). As amostras analisadas foram provenientes de gatos capturados em diferentes pontos de captura, os quais foram anteriormente nomeados no trabalho de Carvalho (2018) como: Academia, Administração, Afonso Pena, Brinquedos, Carandaí, Coreto, Ezequiel Dias, Guarda

Municipal, Hemominas, IEMG (Instituto de Educação de Minas Gerais), Colégio Imaco, Orquidário, Palácio das Artes e Teatro.

**Figura 1.** Localização geográfica do Parque Municipal Américo Renné Giannetti na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.



#### 4.3. Captura, identificação e encaminhamento dos gatos ao Centro de Controle de Zoonoses

Os gatos foram capturados todas as segundas-feiras no PqMARG, salvo em situações impeditivas como ocorrência de chuvas ou feriados, por uma equipe composta por cinco Agentes de Combate a Endemias (ACEs) devidamente treinados para o manejo com felinos domésticos.

Foi realizada a busca ativa dos animais, e a forma de captura dependeu principalmente do comportamento destes, sendo que, gatos ariscos e agressivos foram capturados em armadilhas (gatoeiras) devidamente iscadas; gatos dóceis ou doentes foram capturados diretamente com as mãos, com o auxílio de luvas de raspa para proteção; e para gatos de comportamento dócil, porém que se tornam ariscos em situações de estresse, foi utilizado o puçá. Gatos filhotes, com idade estimada inferior ou igual a 4 meses não foram capturados, assim como animais

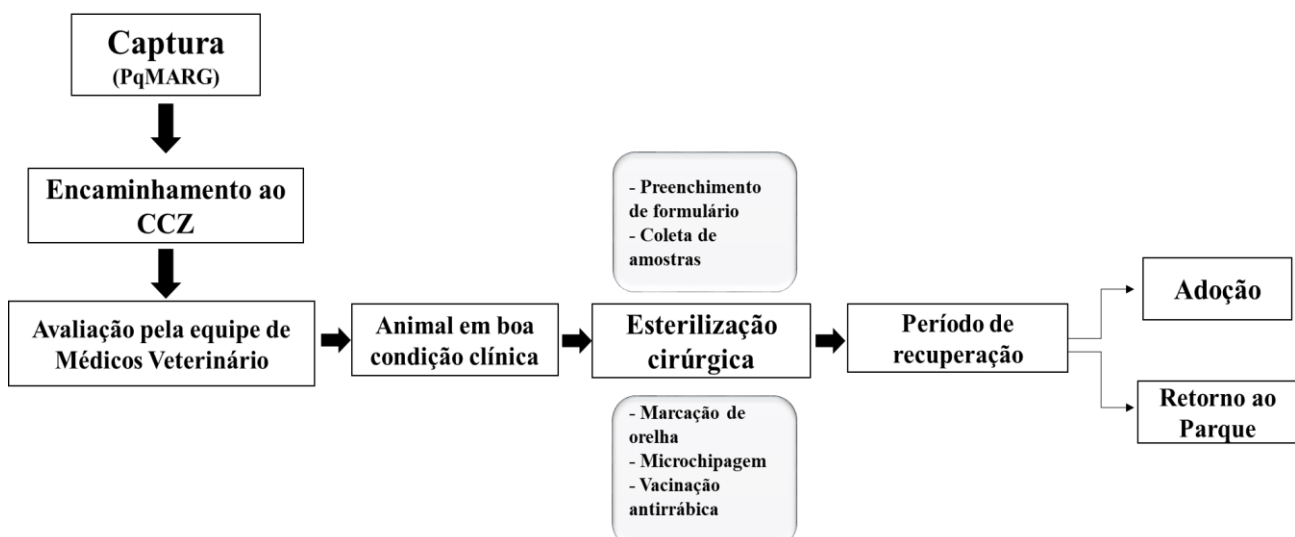
feridos e /ou aparentemente doentes. Nestes casos, ONGs de proteção animal eram acionadas para realizarem o recolhimento do animal para receber os devidos tratamentos veterinários.

Depois de capturados, os gatos foram transportados em carro oficial da prefeitura até o CCZ na regional Norte de Belo Horizonte em caixas de transporte apropriadas e individuais e um formulário era preenchido com os dados de identificação do animal, como: data e local de captura, sexo, faixa etária (filhote, jovem ou adulto), condição corporal (magro, normal ou obeso), porte do animal (pequeno, médio ou grande).

#### 4.4. Coleta de amostras

Ao chegar ao CCZ, os animais foram mantidos no gatil com água e ração para gatos *ad libitum*. Como forma de reduzir os riscos cirúrgicos, o animal foi mantido em jejum alimentar por um período mínimo de oito horas para a realização do procedimento de esterilização, o qual foi realizado todas as terças-feiras no período da manhã pela equipe de médicos veterinários. Apenas animais considerados saudáveis pelo exame clínico e físico realizado pela equipe de médicos veterinários do local eram submetidos a esterilização. O procedimento anestésico, cirúrgico e pós-cirúrgico foi realizado de acordo com a rotina aplicada no CCZ para esterilização de gatos (Figura 2). Durante o procedimento, os animais também receberam identificação permanente mediante aplicação de *microchip* na região do dorso entre as escápulas do animal, e pela marcação de orelha, a qual é realizada por meio de um corte na ponta da orelha direita para as fêmeas e na orelha esquerda para os machos, seguindo-se metodologia adaptada do protocolo *Feral cat protocol- eartipping* e do estudo de Reece, Chawla & Hiby (2013) (CARVALHO, 2018).

**Figura 2.** Fluxo dos gatos capturados no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, Minas Gerais.



Após a esterilização, ainda sedados, os gatos foram encaminhados para uma sala anexa ao centro cirúrgico, onde foi realizada a coleta de material biológico por médicos veterinários residentes de Saúde Pública da Escola de Veterinária (EV) da UFMG. Amostras de sangue foram coletadas preferencialmente através da punção da veia jugular.

A coleta de sangue foi realizada mediante assepsia prévia do local com algodão embebido em álcool 70% e utilizando-se agulhas de calibre adequado e seringas estéreis. Foi coletado sangue total em tubo com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) em um volume mínimo de 2 mL por animal. Para a obtenção de soro, uma parte do sangue foi acondicionada em um tubo sem anticoagulante. Após formação do coágulo, os tubos foram centrifugados e os soros separados e aliqotados. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até seu processamento.

Os animais foram inspecionados para verificar a presença de ectoparasitos (pulgas, piolhos e carrapatos). Os ectoparasitos coletados foram armazenados em microtubos contendo álcool 70%.

## **4.5. Análises laboratoriais**

### **4.5.1. Locais de realização das análises laboratoriais**

As análises laboratoriais referentes à pesquisa dos hemopatógenos foram realizadas no Laboratório de Protozoologia Veterinária (Protovet) e os testes sorológicos para *Toxoplasma gondii* no Laboratório de Toxoplasmose, ambos pertencentes ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da UFMG.

### **4.5.2. Análises parasitológicas**

#### **4.5.2.1. Identificação dos ectoparasitos**

Os ectoparasitos coletados e mantidos armazenados em microtubos contendo álcool 70% foram primeiramente analisados em microscópio Olympus BX40 e microscópio estereoscópico SZ40 (Olympus® Co., Japão). Para a montagem das lâminas dos ectoparasitos, com a finalidade de visualizar estruturas internas e auxiliar na identificação das espécies, foi utilizada a metodologia descrita por Linardi & Guimarães (2000) seguindo-se as etapas de diafanização em Potassa 10% a frio, desidratação com álcool 70°, seguindo-se com a substituição em escala crescente para álcool 80°, 90° e absoluto e clarificação com creosoto

de Faia. A identificação das pulgas foi realizada com o auxílio de chaves de identificação proposta por Linardi e Guimarães (2000) e os piolhos com a chave Tuff (1977).

#### **4.5.2.2. Esfregaços sanguíneos**

Lâminas de esfregaço sanguíneo foram confeccionadas para a busca direta de hemopatógenos a partir das amostras de sangue venoso coletadas e que eram entregues ao laboratório dentro do prazo de 24 horas. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, estas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin<sup>®</sup>, Pinhais, PR, Brasil). A leitura foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40, utilizando a objetiva de imersão (100X).

#### **4.5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

##### **4.5.3.1. Extração e origem dos reagentes**

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada com o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, EUA), seguindo as recomendações do fabricante para a extração de DNA a partir de 300 µL de sangue. Os oligonucleotídeos usados neste trabalho foram produzidos pela empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil)

##### **4.5.3.2. Amplificação do DNA**

A partir das amostras com DNA devidamente extraídas foram realizadas PCRs que poderiam ser do tipo:

- Convencional: *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia canis*, Micoplasmas hemotrópicos, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’;
- *Nested-PCR*: Piroplasmidas, *Ehrlichia/ Anaplasma* de granulócitos e plaquetas, *Ehrlichia/ Anaplasma* de agranulócitos, *A. platys* e *A. phagocytophilum*;
- *Semi-nested-PCR*: *Trypanosoma evansi*

As reações de amplificação foram realizadas conforme os protocolos descritos para cada um dos hemopatógenos pesquisados utilizando os reagentes GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix

(Promega ® Madison, Wisconsin, EUA) [Tampão (pH 8.5); (400  $\mu$ M dATP, dGTP, dCTP e dTTP); 3 mM MgCl<sub>2</sub>], *primers* (iniciadores) *forward* + *reverse*, água miliQ em q.s.p. e DNA-amostra para um volume final de 10 $\mu$ L (9 $\mu$ L Mix + 1 $\mu$ L DNA-amostra). Nas reações do tipo *nested* ou *semi-nested* PCR, que são compostas por segunda reação, o volume final de 10 $\mu$ L era composto por 9 $\mu$ L do Mix + 1 $\mu$ L do produto obtido na primeira reação. As sequências dos iniciadores utilizados, alvos, tamanho esperado dos fragmentos dos produtos de *amplicon* assim como as referências utilizadas estão descritos no quadro 1.

**Quadro 1.** Iniciadores, alvos, tamanho do fragmento (em pares de base- pb) e referências na literatura utilizados para as reações de PCR do tipo convencional, *nested*, *semi-nested*.

Ordem/Gênero/ Espécie	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
<b>Piroplasmida</b>					
<b>1ª reação</b>	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGCCC GAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19 RIB-20	18S rRNA	1700	Zahler et al., 2000
<b>2ª reação</b>	ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumF BAB-rumR		430	Silveira et al., 2011
<i>Cytauxzoon felis</i>	CGAATCGCATTGCTTTATGCTCCAA TTGATACTCCGGAAAGAG	Cytaux F+R	18S rRNA	284	Birkenheuer et al., 2006
<i>Trypanosoma evansi</i>					
<b>1ª reação</b>	GCACAGTATGCAACCAAAAA GTGGTCAACAGGGAGAAAAT	Te1F Te1R	ITS	280	Silveira et al., 2013
<b>2ª reação</b>	CATGTATGTGTTTCTATATG	Te2F		219	
<b><i>Ehrlichia/Anaplasma de Granulócitos e Plaquetas</i></b>					
<b>1ª reação</b>	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTT CCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a GE10r	16S rRNA	932	Massung et al. 1998
<b>2ª reação</b>	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTGGC AGTATTAAAAGCAGCTCCAGG	GE9f GE2		546	
<i>Anaplasma platys</i>					
<b>1ª reação</b>	AGTTTGATCATGGCTCAG CCATGGCGTGACGGGCAGTGT	8-F 1448-R	16S rRNA	*	Ramos et al., 2009
<b>2ª reação</b>	GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG TAGCACTCATCGTTTACAGC	PLATYS-F EHR16S-R		678	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>					
<b>1ª reação</b>	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	MSP4AP5 MSP4AP3	msp4	849	De la Fuente et al., 2005
<b>2ª reação</b>	CTATTGGYGGNGCYAGAGT GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA	msp4f msp4r		381	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG GCCCAGTAACATCATAAGC	MSP2- 3F MSP2- 3R	msp2/p44	334	Zeidner et al., 2000

Quadro 1. Continuação.

<i>Ehrlichia/Anaplasma de Agranulócitos</i>					
1ª reação	ACGGACAATTGCTTATAGCCTTACAAC TTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1F NS16SCH1R	16S rRNA	1195	Kawahara et al., 2009
2ª reação	GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2F NS16SCH2R		443	
<i>Ehrlichia canis</i>	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTAC TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCT	Ehr1401 F Ehr1780 R	virB9	377	Azhahianambi et al., 2018
<i>Mycoplasma hemotrópico</i>	ATACGGCCCATATTCCTACG TGCTCCACCACTTGTTC A	HBTF HBTR	16S rRNA	618	Criado-Fornelio et al., 2003
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	CGTGGAAACTAGAGCTTCGCGAGC ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG	OH-OK 00CB-r1	16SrRNA	274	Watanabe et al., 2008
' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '	ATGCCCTCTGTGGGGGATAGCCG ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG	CA-B2f 00CB-r1	16S rRNA	202	Watanabe et al., 2008
' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> '	AGAGGCGAAGGCGAAAAC CTACAACGCCGAAACACAAA	CMt-F CMt-R	16S rDNA	138	Peters et al., 2008

Amostras de DNA sabidamente positivas e negativas para os alvos analisados foram utilizados como controles. Para controle negativo foi utilizada água mili-Q ultrapura livre de DNase e RNase que acompanha o kit do reagente GoTaq® Green Master Mix (Promega®).

As PCRs foram realizadas em termociclador automático Bio-Rad T100® Thermal Cycler e as etapas dos programas, assim como as respectivas temperaturas de amplificação das reações de *nested*, *semi-nested* e convencional, estão descritas nos quadros 2 e 3, respectivamente. Um fluxograma foi elaborado com a finalidade de facilitar a compreensão das reações de PCRs realizadas (Figura 3).



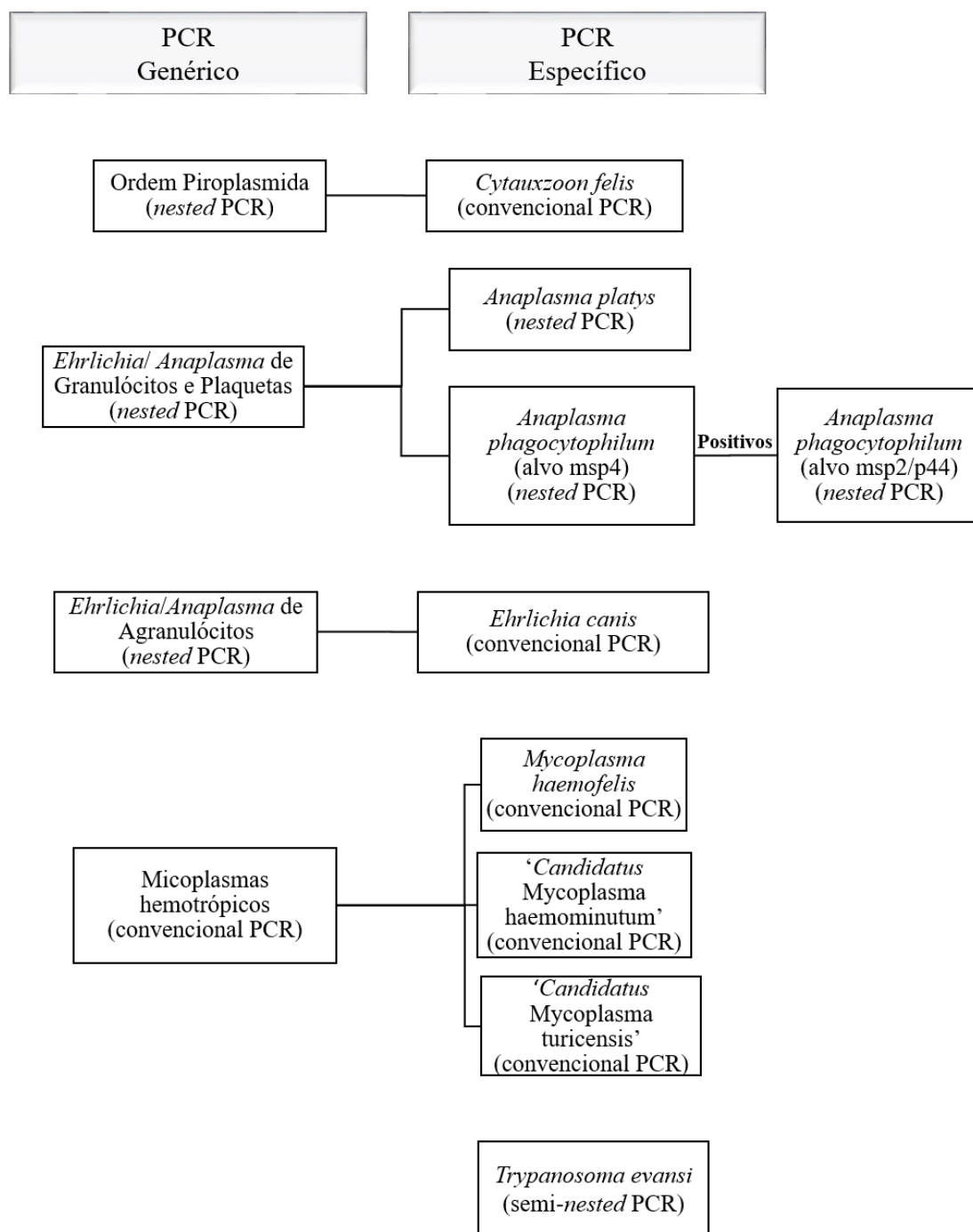
**Quadro 2.** Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo *nested*, *semi-nested* PCR para os alvos pesquisados com as respectivas temperaturas de cada etapa do ciclo e sua duração.

Etapas	Piroplasmida / <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i> de granulócitos e plaquetas ou de agranulócitos/ <i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma platys</i>		<i>Trypanosoma evansi</i>
	1ª e 2ª Reação	1ª Reação	2ª Reação	1ª Reação e 2ª Reação
<b>Desnaturação inicial</b>	95°C (2')	95°C (5')	95°C (5')	94°C (5')
<b>Desnaturação</b>	94°C (30")	95°C (30")	95°C (30")	92°C (1')
<b>Anelamento</b>	55°C (30")	53°C (30")	55°C (30")	56°C (1')
<b>Extensão inicial</b>	72°C (1')	72°C (1'30")	72°C (1'30")	72°C (1'30")
<b>Ciclos</b>	40x	34x	34x	30x
<b>Extensão final</b>	72°C (5')	72°C (5")	72°C (5")	72°C (8")
<b>Hold</b>	12°C (∞)	10°C (∞)	10°C (∞)	10°C (∞)

**Quadro 3.** Programas utilizados para as reações de PCR convencional para os alvos pesquisados com as respectivas temperaturas de cada etapa do ciclo e sua duração.

Etapas	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Micoplasmas hemotrópicos</i>	<i>Mycoplasma haemofelis</i> e 'Candidatus <i>Mycoplasma haemominutum</i> '	'Candidatus <i>Mycoplasma turicensis</i> '	<i>Ehrlichia canis</i>
<b>Desnaturação inicial</b>	95°C (5')	94°C (10')	94°C (5')	95°C (2')	94°C (4')
<b>Desnaturação</b>	95°C (45")	95°C (30")	94°C (45")	95°C (10")	94°C (30")
<b>Anelamento</b>	59°C (45")	60°C (30")	58°C (45")	58°C (30")	63° (30")
<b>Extensão inicial</b>	72°C (1')	72°C (30")	72°C (45")	72°C (30")	72°C (30")
<b>Ciclos</b>	40x	39x	35x	30x	35x
<b>Extensão final</b>	72°C (5")	72°C (10')	72°C (5")	72°C (5')	72°C (2')
<b>Hold</b>	8°C (∞)	10°C (∞)	8°C (∞)	8°C (∞)	12°C (∞)

**Figura 3.** Fluxograma apresentando a sequência das reações de PCR realizadas para as amostras dos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG.



#### 4.5.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados nas reações foram visualizados através de luz ultravioleta (UV) após eletroforese em gel de agarose em tampão TAE 0,5X. A concentração dos géis variou entre 0,8% e 2% de acordo com o tamanho do fragmento esperado para cada agente pesquisado, sendo que fragmentos menores eram mais facilmente visualizados em gel de maior concentração.

Para a realização da leitura em gel, foram adicionados 5µL do produto amplificado mais 2µL do tampão revelador GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Biotium® Fremont, California, USA) diluído em água milli-Q ultra-pura DNase e RNase *free*, na proporção de 1:400.

Foram utilizados marcadores de peso molecular de 1kB ou 100pb (DNA Ladder Plus, Promega®, USA) para mensuração do tamanho dos *amplicons* gerados.

A eletroforese foi realizada a 100V/50mA durante 25 minutos e os resultados visualizados e analisados em transiluminador de luz UV.

#### 4.5.5. Sequenciamento nucleotídico

Amostras positivas nas diferentes reações foram novamente submetidas à PCR para obtenção de volume final de 25 µL em triplicata, sendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix [Tampão (pH 8.5); (400 µM dATP, dGTP, dCTP e dTTP); 3 mM MgCl<sub>2</sub>], 1 µL do mix de *primers* (*forward+reverse*), 2,5 µL de DNA ou produto amplificado na 1ª reação (no caso das reações do tipo *nested*) e água miliQ em q.s.p. Posteriormente foram purificadas pelo QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany), segundo as recomendações do fabricante.

Para confirmação da purificação do material genômico, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.5.4. A quantificação de material genômico total do produto purificado de cada amostra foi dosada por meio da leitura da absorbância em equipamento NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek®). Os produtos purificados foram preparados para sequenciamento segundo as recomendações da empresa ACTGene (Rio Grande do Sul, Brasil) (<https://actgene.com.br/>), sendo sequenciadas por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) empregados nos ensaios

de PCRs, porém em novas alíquotas. As amostras foram preparadas em duplicatas, sendo uma com o iniciador *forward*, e uma com o *reverse*, totalizando duas sequências/amostra, permitindo uma maior confiabilidade das sequências consenso que foram obtidas.

As sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade e os *contigs* foram formados com o auxílio do programa *Electropherogram quality analysis*, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Em seguida, as sequências foram submetidas à procura de homologia com as sequências depositadas em banco de dados, utilizando o software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a comparação da identidade, a classificação das sequências analisadas foi realizada de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no *Genbank*.

#### **4.5.6. Provas sorológicas para *Toxoplasma gondii***

O preparo dos antígenos de *T. gondii* e a realização dos testes sorológicos foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os soros felinos foram testados através das técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste imunoenzimático (ELISA).

##### **4.5.6.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

###### **4.5.6.1.1. Preparo do antígeno**

O antígeno foi adquirido a partir de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal de um camundongo previamente infectado realizada com solução salina tamponada com fosfato (PBS- *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2. Após obtido o material, este foi centrifugado por 20 minutos a 800g para remoção de células contaminantes do camundongo e obtenção do sobrenadante. A este foi acrescentado formol PA até se obter uma concentração de 0,5% do volume final.

Após homogeneizado, a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 800g e ao final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento restante ressuspensionado em PBS pH 7,2, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 800g. Tal processo foi repetido

duas vezes. A suspensão de parasitos obtida ao final foi diluída até se obter cerca de 10 taquizoítos por campo no aumento de 40X em microscópio óptico Olympus CX40. A suspensão final de taquizoítos foi aplicada sobre lâminas de vidro previamente marcadas que foram utilizadas na realização da RIFI.

#### **4.5.6.1.2. RIFI**

A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Veronesi *et al.*, (2017) com modificações. Os soros dos animais foram diluídos a partir de 1:16 (SOBRINHO *et al.*, 2012) até 1:16.384 usando fator 4 de diluição e distribuídos nas lâminas preparadas previamente com o antígeno de taquizoítos. Foram utilizados soros sabidamente positivo e negativo como controles das reações.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e lavadas com PBS pH 7,2. Após a secagem completa, o conjugado anti-imunoglobulina G de gato, marcada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA®. San Luis, Missouri, USA) foi adicionado. Este foi previamente diluído em Azul de Evans em concentração adequada para a reação (1:500).

Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e lavadas com PBS pH 7,2 novamente. Ao final, foi adicionado glicerina tamponada nas lâminas as quais foram posteriormente cobertas por lamínula para a realização da leitura em microscópio de fluorescência Olympus IX70-FLA.

#### **4.5.6.2. Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii***

##### **4.5.6.2.1. Preparo de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg)**

O antígeno solúvel de *T. gondii* (denominado STAg) utilizado para sensibilizar a placa de poliestireno de 96 poços foi preparado seguindo o protocolo descrito por Buery *et al.*, (2014) com modificações. Assim como descrito anteriormente, o antígeno foi adquirido a partir de taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH), a partir da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos infectados e o material resultante foi centrifugado durante 20 segundos a 800g para eliminação de debris celulares e coleta do sobrenadante, o qual foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g.

Em seguida, após o descarte do sobrenadante, o *pellet* formado contendo os taquizoítos foi ressuspendido em PBS, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Os taquizoítos foram lavados três vezes com PBS, sendo centrifugados a 1400g, por 10 minutos entre as lavagens.

Na sequência, os taquizoítos foram contados em câmara hemocitométrica em uma concentração acertada para  $1 \times 10^9$  taquizoítos/mL. A suspensão de taquizoítos foi processada por ultrassom (*Ultrasonic Homogenizer* - 4710; *Coler-Palmer Instrument Co.*) em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo) durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo para que houvesse o rompimento das formas parasitárias. Por fim, a suspensão com os taquizoítos rompidos foi centrifugada a 10000g a 4°C durante 30 minutos e a concentração de proteínas do antígeno obtido foi determinada pelo método de Lowry et al., (1951). Este então foi estocado a -20°C até o momento do seu uso.

#### **4.5.6.2.2. Ensaio imunoenzimático para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii***

Numa primeira etapa, para determinar as melhores concentrações de antígeno (STAg), de soro e de conjugado a serem utilizados no ELISA, foram realizados previamente ensaios de padronização baseados em titulação *checkboard*. Para isso, o antígeno foi avaliado nas concentrações 2,0µg/well, 1,0 µg/well e 0,5 µg/well. Dois soros padrões positivos e dois negativos foram avaliados nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. O conjugado foi avaliado nas diluições 1:7.500 e 1:15.000. Nesta etapa, foram utilizados dois soros positivos obtidos de gatos naturalmente infectados e dois soros negativos.

Os quatro soros controle foram definidos previamente por RIFI (procedimento desenvolvido no Laboratório de Toxoplasmose- ICB/UFMG e descrito anteriormente) e por Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI) (kit comercial Toxotest®- Wiener Lab, Rosario, Argentina), realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma vez definidas as melhores concentrações para cada produto, realizou-se a detecção de anticorpos IgG anti *T. gondii* nos soros dos felídeos incluídos no estudo, os quais foram testados individualmente, em duplicata. O processo seguiu o protocolo descrito por Andrade et al., (2013) com modificações.

Placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (SARSTEDT®, Nümbrecht, Germany) foram então sensibilizadas com 100µL do antígeno, o qual foi adicionado em

cada poço diluído em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) na concentração previamente padronizada. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a solução contendo o antígeno foi desprezada e a placa lavada duas vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (SST). Após secagem da placa por inversão vigorosa em papel absorvente, 100 µL de uma solução bloqueadora contendo PBS-Caseína 2% foi adicionada em cada poço, sendo a placa incubada por 30 minutos a 37°C.

Após esse intervalo, o material foi desprezado e a placa lavada duas vezes com SST e 100 µL dos soros dos gatos, previamente diluídos em PBS-Tween 20 a 0,05% + Caseína 0,25% (PBS-T/Caseína 0,25%) na concentração padronizada, foram adicionados em cada poço da placa.

Foram utilizados como controles duas amostras de soro positivas e seis amostras negativas em cada placa, definidas previamente por RIFI e HAI. Após o acréscimo dos soros felinos e controles, a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C e ao final, os soros foram desprezados e a placa lavada quatro vezes com SST.

Posteriormente, foi adicionado à placa o conjugado anti IgG de felídeo marcado com peroxidase na diluição previamente determinada em solução contendo PBS-T/Caseína 0,25% e esta foi incubada durante 45 minutos a 37°C e novamente lavada quatro vezes com SST.

Por fim, uma solução substrato-reveladora composta por 3µg de  $\sigma$ -*phenylenediamine* (SIGMA®), 15mL de solução de ácido cítrico e 3µL de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 volumes foi preparada no momento do seu uso e 100µL dessa solução foi adicionada em cada poço da placa. Após 20 minutos, houve interrupção da reação com a adição de 25µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- 4N) em cada poço e leitura em leitor de ELISA (Bio-Rad® Modelo 3550) com filtro de 490nm. Cada placa teve seu ponto de corte (*cut off*) calculado pela média das absorbâncias das seis amostras de soros negativos para *T. gondii* mais três desvios-padrões. A média da absorbância dos soros testados em duplicata foi dividido pelo valor do *cut off* da placa com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR). Os soros que apresentaram os valores de IR < 0,9 foram considerados negativos. Aqueles com IR > 1,1 foram considerados positivos e aqueles que apresentarem um valor de IR entre 0,9 e 1,1 foram testados novamente para confirmação do resultado.

#### **4.5.6.2.3. Avaliação da avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii***

Esta técnica foi realizada de acordo com protocolo descrito por Suárez-Aranda et al., (2000) com modificações. A avidéz foi determinada através de um ELISA convencional como descrito no item anterior, porém acrescido de uma lavagem adicional com uréia 6M em PBS- T20-0,5% antes da etapa da aplicação do conjugado, em apenas metade da placa (colunas de 1 a 6). Nas colunas de 7 a 12 foram aplicados os mesmos soros de forma idêntica aos das colunas 1 a 6. As colunas de 7 a 12 passaram por lavagem normal, apenas com PBS-T20- 0,5%, antes da aplicação do conjugado

Em seguida, todos os orifícios da placa receberam lavagem com PBS-T, e esta foi mantida em agitação durante 5 minutos. A partir da adição do conjugado, o procedimento seguiu as etapas do ELISA convencional descrito anteriormente.

A avidéz de anticorpos IgG foi calculada como a razão entre a absorbância da média de cada soro tratado com uréia (AU) e absorbância do mesmo soro não tratado com uréia (A) e expressa em percentagem:  $AU/A \times 100$  (ANDRADE et al., 2013).

Para este trabalho usamos o critério definido por Suárez-Aranda et al. (2000), no qual valores de avidéz  $\leq 50\%$  sugerem infecção aguda, enquanto valores acima de 50% indicam infecção crônica.

#### **4.6. Análise de dados**

A partir dos resultados obtidos foram realizadas análises estatísticas dos dados com o auxílio do programa Stata versão 16 (StataCorp), seguindo os procedimentos descritos por Fávero & Belfiore (2017), e foi considerado um nível de significância estatística de 5% em todos os testes realizados.

A análise descritiva das variáveis do estudo inclui o estudo da frequência de resultados positivos e negativos ou reagentes ou não reagentes para as variáveis qualitativas e o cálculo da média, mediana, valores máximos e mínimos para as variáveis quantitativas. A normalidade das variáveis quantitativas foi avaliada pela elaboração de histogramas e pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.



O teste exato de Fisher foi realizado para verificação da associação entre os resultados qualitativos dos testes diagnósticos realizados e as variáveis sexo e faixa etária dos animais

O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para verificar as diferenças entre os resultados de ELISA e o número de ectoparasitos e sexo e também entre os resultados de ELISA e o número de ectoparasitos em relação ao gato ser adulto.

O teste *Kappa* foi utilizado para medir a concordância do ELISA para diagnóstico de toxoplasmose em relação a RIFI. A sensibilidade e a especificidade do ELISA foram calculadas considerando a RIFI como teste padrão na diluição 1:16.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características da população estudada

Durante o período de 2015 a 2018 foram recebidas pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB-UFMG) amostras de 237 gatos provenientes do PqMARG.

Destas amostras, 51,5% (122/237) dos animais eram fêmeas e 48,5% (115/237) eram machos. Para a variável faixa etária, estes animais foram agrupados em duas categorias: não-adultos, a qual compreendeu gatos filhotes (< 6 meses) e jovens (>6 meses  $\leq$  12 meses) e adultos ( $\geq$  12 meses). As principais características observadas para a estimativa da idade foram o porte e dentição dos animais (CARVALHO, 2018). No geral, 32,5% (77/237) animais foram classificados como não-adultos e 67,5% (160/237) como adultos. Todos os animais (100%) foram classificados como sem raça definida (SRD) (CARVALHO, 2018). A tabela 1 apresenta os dados referentes aos animais que tiveram amostras colhidas, classificados de acordo com o sexo, ano de captura e faixa etária.

**Tabela 1.** Descrição das frequências encontradas na população de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG, que tiveram amostras colhidas, em relação ao ano de captura, sexo e idade.

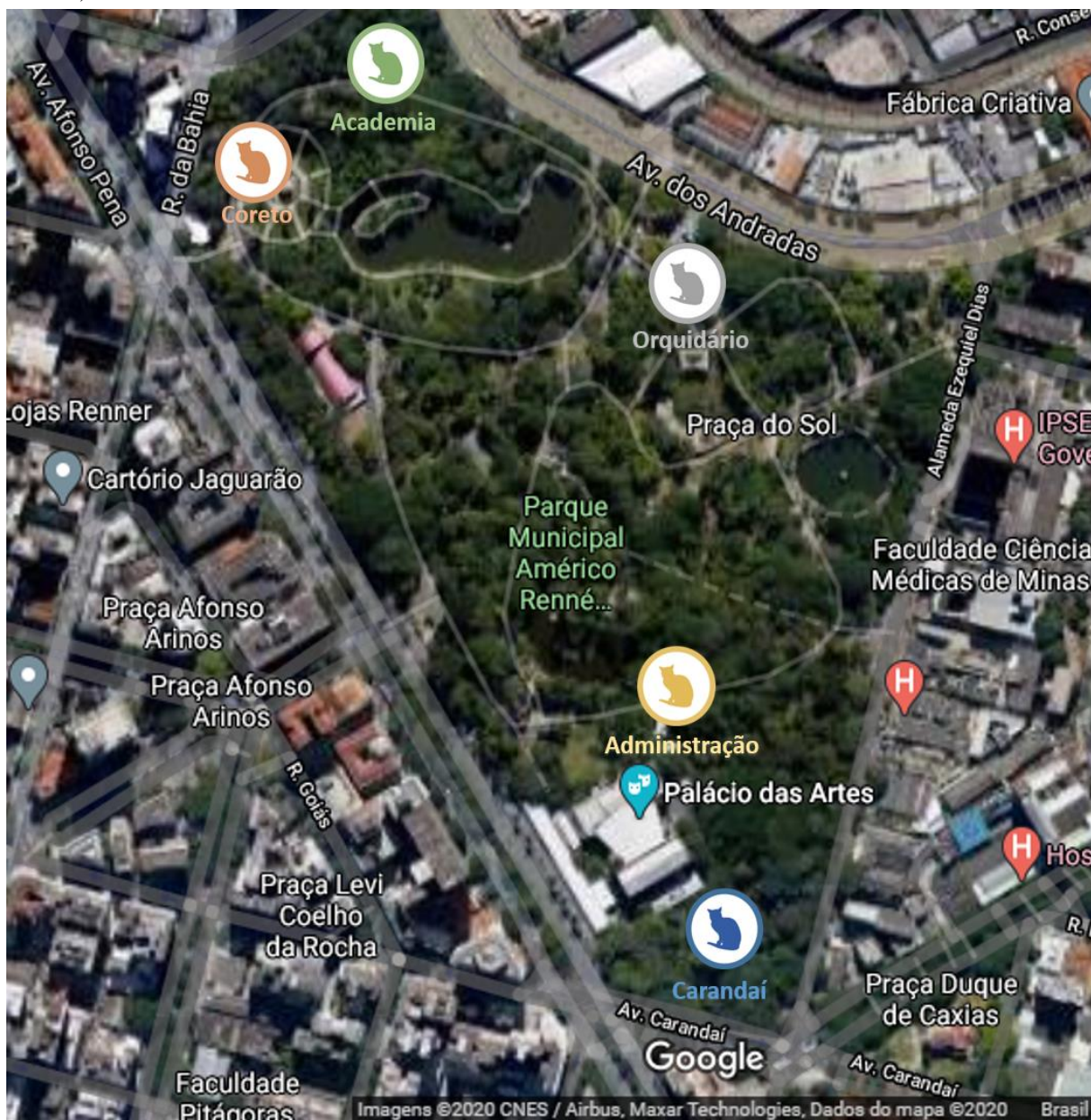
Ano	MACHOS CAPTURADOS						FÊMEAS CAPTURADAS					
	Não adulto		Adulto		Total		Não adulto		Adulto		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2015	1	2,8	2	2,5	3	2,6	1	2,5	3	3,7	4	3,3
2016	19	52,7	36	45,6	55	47,9	21	51,2	40	49,4	61	50
2017	16	44,4	41	51,9	57	49,5	15	36,6	33	40,7	48	39,3
2018	0	0	0	0	0	0	4	9,7	5	6,2	9	7,4
<b>Total</b>	<b>36/115</b>	<b>31,3</b>	<b>79/115</b>	<b>68,7</b>	<b>115/237</b>	<b>48,5</b>	<b>41/122</b>	<b>33,6</b>	<b>81/122</b>	<b>66,4</b>	<b>122/237</b>	<b>51,5</b>

Em relação aos locais de captura dos gatos que tiveram amostras enviadas para análises, cinco pontos tiveram maior número de recolhimentos, sendo estes: portaria da rua Carandaí com 22,8% (54/237), Administração 15,2% (36/237), Orquidário 11,8% (28/237), Coreto 9,7% (23/237) e Academia 7,6% (18/237) (Tabela 2). Na figura 4, é possível visualizar as localizações destes pontos dentro dos limites do PqMARG. Os demais pontos onde houveram capturas estão descritos na tabela 2. Nos anos de 2015 e 2018 foram recebidas amostras de somente um mês de captura, enquanto nos anos de 2016 e 2017, amostras foram enviadas durante os 12 meses. O número total de amostras coletadas, de acordo com o ano, se encontra na tabela 2. Os anos de 2016 e 2017 foram os anos nos quais houveram maior número de coleta de amostras dos gatos do PqMARG, com 116 (48,9%) e 105 (44,3%), respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pontos dentro do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG com as respectivas frequências de capturas dos animais que tiveram material enviado ao Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB-UFMG) durante os anos de 2015 a 2018.

PONTOS DE CAPTURA	ANO				Total	%
	2015	2016	2017	2018		
Carandaí	0	24	26	4	<b>54</b>	<b>22,8%</b>
Administração	0	19	16	1	<b>36</b>	<b>15,2%</b>
Orquidário	2	18	8	0	<b>28</b>	<b>11,8%</b>
Coreto	1	9	13	0	<b>23</b>	<b>9,7%</b>
Academia	1	5	11	1	<b>18</b>	<b>7,6%</b>
Brinquedos	0	3	10	1	<b>14</b>	<b>5,9%</b>
Colégio Imaco	0	8	4	1	<b>13</b>	<b>5,5%</b>
Palácio das Artes	2	7	4	0	<b>13</b>	<b>5,5%</b>
Afonso Pena	0	8	3	0	<b>11</b>	<b>4,6%</b>
Teatro	0	6	2	1	<b>9</b>	<b>3,8%</b>
IEMG	0	8	0	0	<b>8</b>	<b>3,4%</b>
Ezequiel Dias	0	1	5	0	<b>6</b>	<b>2,5%</b>
Hemominas	0	0	3	0	<b>3</b>	<b>1,3%</b>
Guarda Municipal	1	0	0	0	<b>1</b>	<b>0,4%</b>
<b>Total</b>	<b>7 (3,0%)</b>	<b>116 (48,9%)</b>	<b>105 (44,3%)</b>	<b>9 (3,8%)</b>	<b>237</b>	<b>100%</b>

**Figura 4.** Ilustração dos pontos com maior número de capturas de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG que tiveram material enviado ao Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB-UFMG) entre os anos de 2015 a 2018.



**Fonte:** Adaptado de Carvalho, P. C. F. B. Caracterização populacional e descrição do manejo de gatos errantes no Parque Municipal Américo Renné Gianetti, Belo Horizonte, MG (2018).

## 5.2. Identificação de ectoparasitos

Os ectoparasitos coletados foram identificados com o auxílio das chaves taxonômicas anteriormente descritas.

A infestação por pulgas foi verificada em 13,9% (33/237) gatos, sendo coletadas 61 espécimes, todas pertencentes ao gênero *Ctenocephalides* (Siphonaptera: Pulicidae), sendo 95,1% (58/61) da espécie *C. felis felis*, 3,3% (2/61) *C. canis* e 1,6% (1/61) não identificada devido ao exemplar encontrar-se danificado devido às más condições de coleta e armazenamento.

Em relação ao ectoparasitismo, 54,5% (18/33) dos felinos infestados eram fêmeas e 45,5% (15/33) machos (Tabela 3). Quanto à faixa etária, 42,4% (14/33) dos animais eram não adultos e 57,6% (19/33) adultos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa do ectoparasitismo em relação ao sexo do animal ( $p=0,3114$ ) e faixa etária ( $p=0,3248$ ). (Tabela 3).

Piolhos foram o segundo grupo de ectoparasitos encontrado, com oito espécimes coletadas de apenas um animal (1/237) (0,4%). Todos pertenciam à ordem Mallophaga, espécie *Felicola subrostratus*. Não foi encontrado nenhum carrapato nos gatos durante o momento das coletas.

**Tabela 3.** Distribuição numérica e frequência de gatos ectoparasitados provenientes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de 2015 a 2018.

Variável	nº de animais (%) N=33	Valor <i>p</i>
<b>Sexo</b>		
Fêmeas	18 (54,5)	0,3114
Machos	15 (45,5)	
<b>Faixa etária</b>		
Não adulto	14 (42,4)	0,3248
Adulto	19 (57,6)	

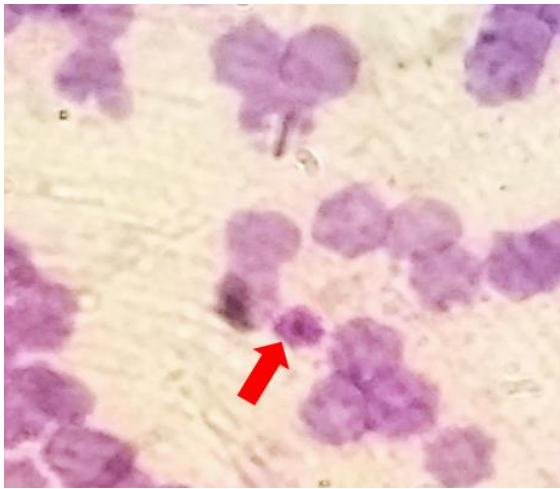
valor *p* significante < 0,05. N– total de animais infestados por ectoparasitos. n– número de animais infestados. (%) percentual de animais infestados.

## 5.3. Análise dos esfregaços sanguíneos

Foram realizados 50 esfregaços sanguíneos (21,1%) dos 237 animais capturados entre os anos de 2015 a 2018. Durante a leitura das lâminas, 42/50 (84%) estavam negativas para hemopatógenos. Entre as oito lâminas (16%) que foram visualizadas estruturas sugestivas de

hemopatógenos, sete (14%) apresentaram estruturas caracterizadas como inclusões plaquetárias basofílicas sugestivas de *Anaplasma platys* (Figura 5). Em uma lâmina (2%) foi visualizado estrutura semelhante a merozoítos de hemoparasitos da ordem Piroplasmida (Figura 6).

**Figura 5.** Plaqueta apresentando inclusão basofílica sugestiva de *Anaplasma platys* em lâmina de um gato do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG (seta vermelha). Aumento 100X.



**Figura 6.** Estrutura semelhante à merozoítos encontrada em hemácia de um gato do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG (seta vermelha). Aumento 100X.



#### 5.4. Diagnóstico molecular de hemopatógenos

Do total de 237 animais, 209 gatos tiveram amostras de sangue coletadas e tiveram DNA devidamente extraído. Destes, 58 animais foram dados como positivos na PCR genérica para detecção de hemoparasitos da ordem Piroplasmida (Figura 7), correspondendo a um percentual de 27,9% (Tabela 4). Utilizando iniciadores específicos para a espécie *C. felis*, apenas cinco foram positivos (2,4%) (Tabela 4). Em apenas uma lâmina de esfregaço foi visualizada estrutura semelhante a merozoítos característicos de agentes da ordem Piroplasmida, porém, o mesmo animal não foi positivo em nenhuma das PCRs realizadas.

Uma tentativa de sequenciamento nucleotídico de sete amostras positivas na reação genérica para patógenos da ordem Piroplasmida, que foram selecionadas com base na intensidade da banda resultante na eletroforese, foi realizada para concluir o diagnóstico, porém, esta não obteve sucesso.

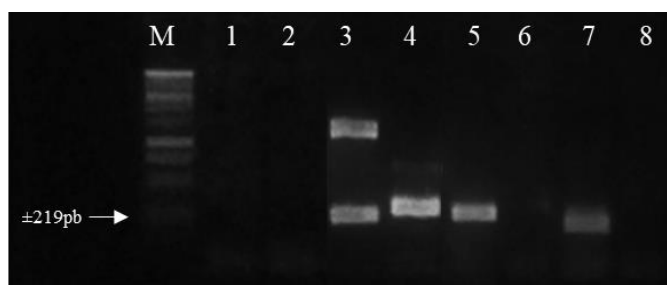


**Figura 7.** Gel de agarose 1% em que é possível observar exemplos de amostras positivas pela *nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados na sequência parcial do gene 18S rRNA para a pesquisa de parasitos pertencentes a ordem Piropasmida. M: marcador molecular em escala de 1 kB; Coluna 1: controle positivo; Colunas 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (430pb); Colunas: 20 e 21: branco da primeira e segunda reação, respectivamente.



Para *T. evansi* (Figura 8), 54 (25,8%) gatos foram positivos (Tabela 4). Adotando a mesma condição de seleção citada anteriormente, uma amostra foi enviada para sequenciamento nucleotídico a fim de confirmar o diagnóstico, porém, não houve sucesso. Porém, o *primer* utilizado na reação é específico para *T. evansi*.

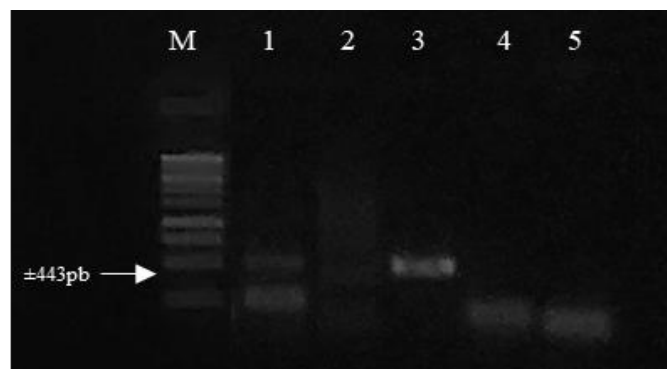
**Figura 8.** Gel de agarose 1,5% em que é possível observar exemplos de amostras positivas pela *semi-nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados no alvo ITS para a pesquisa de *Trypanosoma evansi*. M: marcador molecular em escala de 1 kB; Colunas 1, 2 e 6: amostras negativas; Colunas 3, 4 e 5: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (219pb); Coluna 7: controle positivo; Coluna 8: branco



Para bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae, 93 (44,5%) animais foram positivos para *Ehrlichia/ Anaplasma* de granulócitos e plaquetas e 78 (37,3%) para reação específica para a espécie *A. platys*. Nenhum animal foi positivo na reação para *A. phagocytophilum* para ambos os alvos moleculares utilizados (Tabela 4). Amostras de três animais detectados na PCR genérica e que não obtiveram detecção para *A. platys* nem para *A. phagocytophilum* foram enviadas para sequenciamento, porém, sem sucesso.

Já para *Ehrlichia/ Anaplasma* de agranulócitos, 44 (21,0%) animais apresentaram produtos de PCR próximos ao tamanho do fragmento esperado (Figura 9), porém, nenhum destes foi positivo quando realizada reação específica para a espécie *E. canis* (Tabela 4). Da mesma forma, foram enviadas para sequenciamento quatro amostras que não apresentaram resultado conclusivo para os alvos específicos, porém, também não houve sucesso.

**Figura 9.** Gel de agarose 1% em que é possível observar exemplos de amostra positiva pela *nested* PCR ao utilizar iniciadores baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA para a pesquisa de *Ehrlichia/ Anaplasma* de agranulócitos. M: marcador molecular em escala de 1 kB; Coluna 1: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (443pb); Coluna 2: amostra negativa; Coluna 3: controle positivo; Colunas 4 e 5: branco da primeira e segunda reação, respectivamente.



Em relação aos micoplasmas hemotrópicos, 102 gatos (48,8%) foram positivos para alguma espécie de hemoplasma sendo que, 39 (18,7%) foram positivos na reação específica para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (CMhm), nove (4,3%) para a espécie *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) e dois (0,9%) para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (CMt) (Tabela 4).



**Tabela 4.** Distribuição numérica e frequência de gatos PCR positivos para hemopatógenos provenientes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de 2015 a 2018.

Hemopatógeno	Número de animais positivos/ Número de animais avaliados					%
	2015	2016	2017	2018	Total	
<b>Piroplasmas</b>	2/7	24/116	32/105	0/9	58/209	27,9
<i>Cytauxzoon felis</i>	2/7	0/116	3/105	0/9	5/209	2,4
<b><i>Trypanosoma evansi</i></b>	4/7	34/116	16/105	0/9	54/209	25,8
<b>Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas</b>	0/7	41/116	50/105	2/9	93/209	44,5
<i>Anaplasma platys</i>	0/7	31/116	45/105	2/9	78/209	37,3
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0/7	0/116	0/105	0/9	0	
<b>Anaplasmataceae de agranulócitos</b>	1/7	10/116	33/105	0/9	44/209	21,0
<i>Ehrlichia canis</i>	0/7	0/116	0/105	0/9	0	
<b>Micoplasmas hemotrópicos</b>	1/7	53/116	46/105	2/9	102/209	48,8
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	0/7	5/116	4/105	0/9	9/209	4,3
‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	1/7	30/116	8/105	0/9	39/209	18,7
‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	0/7	1/116	1/105	0/9	2/209	0,9

Entre os 209 gatos, sete (3,4%) apresentaram coinfeção com mais de uma espécie de hemoplasma, sendo que seis animais estavam coinfectados com CMhm e Mhf e um com CMhm e CMt (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti que apresentaram coinfeção com mais de uma espécie de micoplasma hemotrópico entre 209 gatos estudados.

Espécies de micoplasmas hemotrópicos	nº de animais coinfectados	%
CMhm+ Mhf	6	2,9
CMhm+ CMt	1	0,5
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>3,4</b>

Quatro amostras positivas para as três espécies de hemoplasmas foram enviadas para sequenciamento nucleotídico a fim de confirmar os resultados encontrados e para realizar a comparação com sequências já depositadas no *Genbank*. Duas obtiveram sucesso no

sequenciamento para a espécie Mhf e uma para CMhm e nenhuma para CMt. As informações sobre a homologia assim como a identificação das sequências depositadas podem ser conferidas no quadro 4.

**Quadro 4.** Identidade do DNA das espécies hemoplasmas encontradas em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG a partir de sequência parcial do gene 16S rRNA.

<b>Hemoplasma</b>	<b>Espécie (n° de amostras sequenciadas)</b>	<b>Similaridade (%) Genbank (BLAST®)</b>
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Gato doméstico (2)	<p><i>Mycoplasma haemofelis</i> de gato doméstico do Chile- MN543634 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma haemofelis</i> de gato-chileno (<i>Leopardus guigna</i>) do Chile- MN543633 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma haemofelis</i> de gato doméstico da China- MH447082 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma</i> spp. de quati (<i>Nasua nasua</i>) da região do Pantanal, Brasil- KY002661 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma haemofelis</i> de gato doméstico da Itália- KR905465 e KR905462 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma haemofelis</i> de gato doméstico do Brasil- KM275247 (100%)</p>
‘ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i> ’	Gato doméstico (1)	<p>‘<i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i>’ de gato doméstico do Chile- MN54368 e MN53625 (100%)</p> <p><i>Mycoplasma</i> spp. de gato doméstico do Brasil- MF192849 (100%)</p> <p>‘<i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i>’ de gato doméstico do Brasil- KY780179 e KY780178 (100%)</p> <p>‘<i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i>’ de gato doméstico da Itália- KR905456 e KR905455 (100%)</p>

A tabela 6 apresenta as distribuições de frequências de infecção por hemopatógenos em relação ao sexo do animal. Foi observada associação estatisticamente significativa entre o sexo do animal e a infecção por *M. haemofelis*, sendo que os gatos machos tiveram maior frequência de infecção por esse agente do que as fêmeas ( $p= 0,017$ ).

**Tabela 6.** Resultados moleculares para os hemopatógenos pesquisados nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de acordo com o sexo.

Variáveis resposta	Sexo		Valor <i>p</i>
	Feminino n (%) N=103	Masculino n (%) N=106	
<b>Piroplasmida</b>			
Positivo	23 (22,3)	35 (33,0)	0,084
Negativo	80 (77,7)	71 (67,0)	
<b><i>Cytauxzoon felis</i></b>			
Positivo	1 (1,0)	4 (3,8)	0,185
Negativo	102 (99,0)	102 (96,2)	
<b><i>Trypanosoma evansi</i></b>			
Positivo	22 (21,4)	32 (30,2)	0,145
Negativo	81 (78,6)	74 (69,8)	
<b>Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas</b>			
Positivo	45 (43,7)	48 (45,3)	0,816
Negativo	58 (56,3)	58 (54,7)	
<b><i>Anaplasma platys</i></b>			
Positivo	36 (35,0)	42 (39,6)	0,579
Negativo	67 (65,0)	64 (60,4)	
<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	0 (0,00)	-
Negativo	103 (100,0)	106 (100,0)	
<b>Anaplasmataceae de agranulócitos</b>			
Positivo	20 (19,4)	24 (22,6)	0,568
Negativo	83 (80,6)	82 (77,4)	
<b><i>Ehrlichia canis</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	0 (0,00)	-
Negativo	103 (100,0)	106 (100,0)	
<b>Micoplasmas hemotrópicos</b>			
Positivo	46 (44,7)	56 (52,8)	0,238
Negativo	57 (55,6)	50 (47,2)	
<b><i>Mycoplasma haemofelis</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	9 (8,5)	<b>0,017*</b>
Negativo	103 (100,0)	97 (91,5)	
<b>‘<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>’</b>			
Positivo	16 (15,5)	23 (21,7)	0,253
Negativo	87 (84,5)	83 (78,3)	
<b>‘<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>’</b>			
Positivo	1 (1,0)	1 (1,0)	0,983
Negativo	102 (99,0)	105 (99,0)	

\*Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos no teste Exato de Fisher. N– total de amostras testadas.  
n– número de animais positivos. (%) percentual de animais positivos.

A tabela 7 apresenta as distribuições de frequências das infecções pelos hemopatógenos pesquisados em relação à categoria de faixa etária dos gatos.

**Tabela 7.** Resultados moleculares para os hemopatógenos pesquisados nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG de acordo com a faixa etária.

Variáveis resposta	Gato adulto		Valor <i>p</i>
	Não n (%) N=66	Sim n (%) N=143	
<b>Piroplasmida</b>			
Positivo	16 (24,2)	42 (29,4)	0,507
Negativo	50 (75,8)	101 (70,6)	
<b><i>Cytauxzoon felis</i></b>			
Positivo	3 (4,5)	2 (1,4)	0,329
Negativo	63 (95,5)	141 (98,6)	
<b><i>Trypanosoma evansi</i></b>			
Positivo	18 (27,3)	36 (25,2)	0,737
Negativo	48 (72,7)	107 (74,8)	
<b>Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas</b>			
Positivo	26 (39,4)	67 (46,8)	0,369
Negativo	40 (60,6)	76 (53,2)	
<b><i>Anaplasma platys</i></b>			
Positivo	22 (33,3)	56 (39,2)	0,513
Negativo	44 (66,7)	87 (60,8)	
<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	0 (0,00)	-
Negativo	66 (100,0)	143 (100,0)	
<b>Anaplasmataceae de agranulócitos</b>			
Positivo	14 (21,2)	30 (21,0)	1,000
Negativo	52 (78,8)	113 (79,0)	
<b><i>Ehrlichia canis</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	0 (0,00)	-
Negativo	66 (100,0)	143 (100,0)	
<b>Micoplasmas hemotrópicos</b>			
Positivo	27 (40,9)	75 (52,4)	0,139
Negativo	39 (59,1)	68 (47,6)	
<b><i>Mycoplasma haemofelis</i></b>			
Positivo	0 (0,00)	9 (6,3)	<b>0,0372*</b>
Negativo	66 (100,0)	134 (93,7)	
<b>‘<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>’</b>			
Positivo	11 (16,7)	28 (19,6)	0,766
Negativo	55 (83,3)	115 (80,4)	
<b>‘<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>’</b>			
Positivo	0 (0,00)	2 (1,4)	1,000
Negativo	66 (100,0)	141 (98,6)	

\*Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos no teste Exato de Fisher. N– total de amostras testadas. n– número de animais positivos. (%) percentual de animais positivos.

Em relação a variável faixa etária houve associação estatisticamente significativa entre o animal ser adulto e o diagnóstico de *M. haemofelis* ( $p=0,0372$ ) cujos resultados positivos foram encontrados apenas em adultos (Tabela 7). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre infestação por ectoparasitos e o animal ser positivo para algum dos hemopatógenos pesquisados pela PCR ( $p >0,05$ ).

## 5.5. Testes sorológicos para *Toxoplasma gondii*

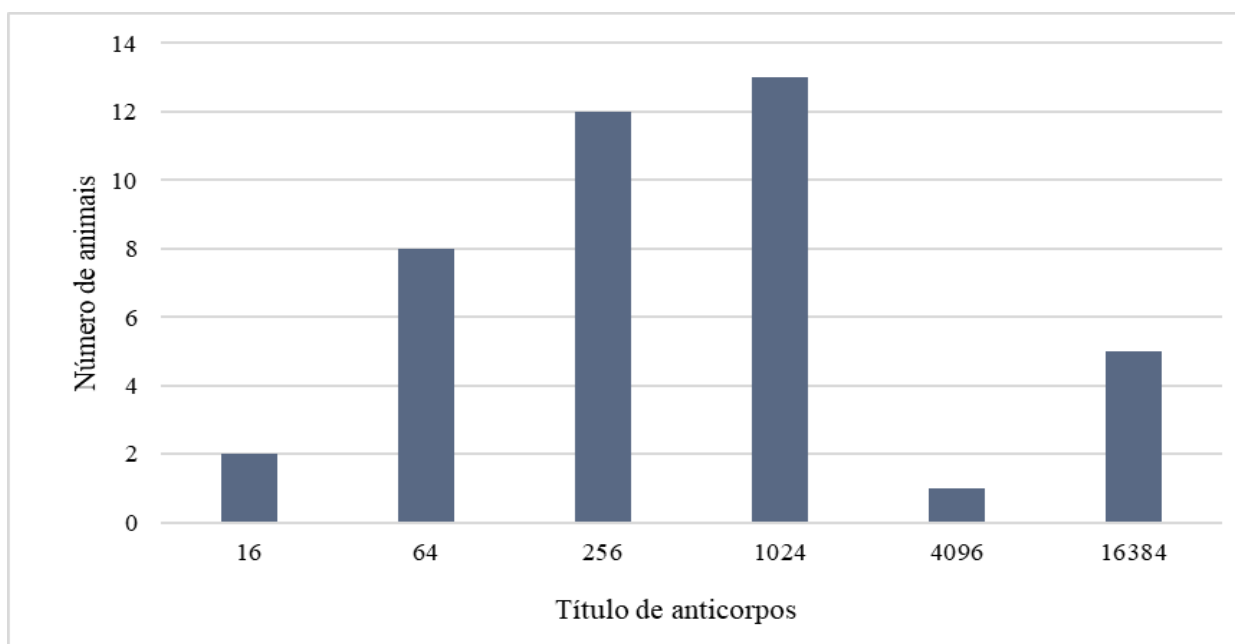
### 5.5.1. ELISA e RIFI para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em felinos

Na padronização do ELISA foi determinado que a melhor concentração de antígeno capaz de distinguir soros padrões positivos e negativos testados em diferentes diluições foi de 1,0 $\mu$ g de proteína/well, com amostras de soro diluídas a 1:100 e conjugado anti-IgG de felino diluído a 1:15.000.

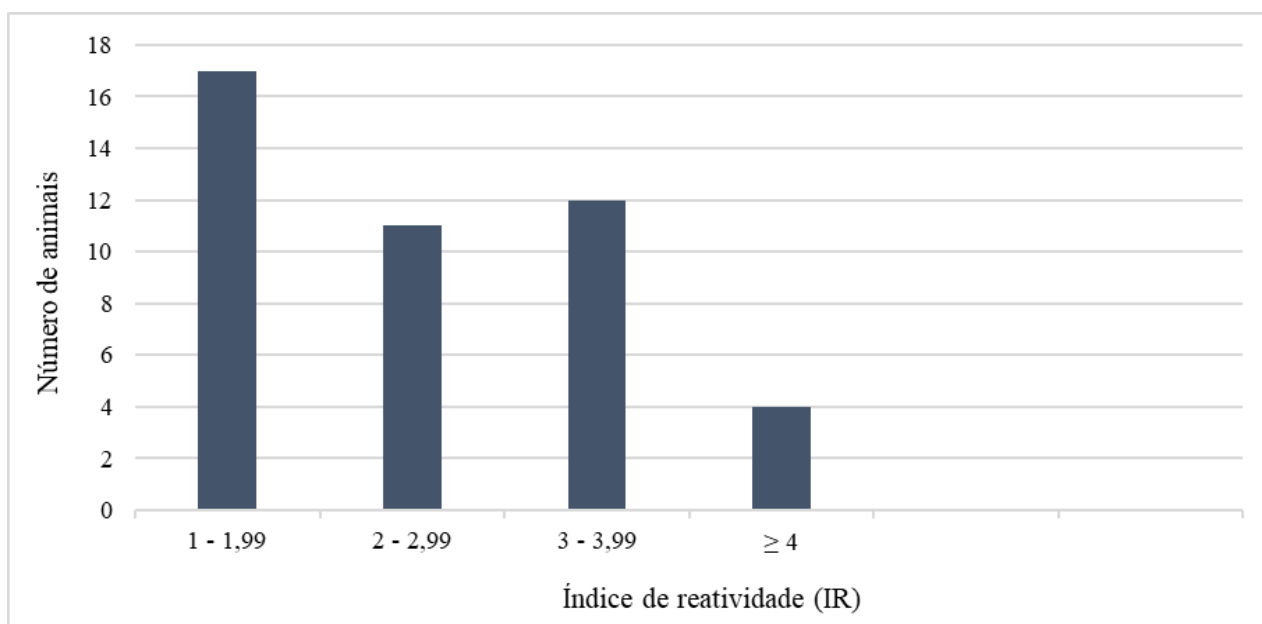
Dos 209 gatos que tiveram amostras de soro submetidas aos testes sorológicos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, 41 foram considerados reagentes pela RIFI e 44 pelo ELISA, sendo que a soroprevalência encontrada foi respectivamente de 19,6% e 21,0% para cada um dos testes (Tabela 8).

Entre os 41 felinos positivos na RIFI (19,6%), 4,9% (2/41) apresentaram título de 1:16; 19,5% (8/41) de 1:64; 29,3% (12/41) de 1:256; 31,7% (13/41) de 1:1024; 2,4% (1/41) de 1:4096 e 12,2% (5/41)  $\geq$  1:16384 (Gráfico 1). Soros que apresentaram títulos  $<$  1:16 foram considerados negativos (80,4%) (168/209). Para o teste de ELISA, o índice de reatividade (IR) variou de 0,00 a 4,93, sendo que soros que apresentaram  $IR <$  1,00 (79%) (165/209) foram considerados negativos. Entre os que apresentaram  $IR \geq$  1,00 (21,0%), em 38,6% (17/44) o IR estava entre 1,00 e 1,99; 25% (11/44) entre 2,00 e 2,99; 27,3% (12/44) entre 3,00 e 3,99 e 9,1% (4/44) com  $IR \geq$  4 (Gráfico 2).

**Gráfico 1.** Frequência de títulos de anticorpos nos soros de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletados entre os anos de 2015 a 2018 soropositivos por RIFI.



**Gráfico 2.** Frequência dos índices de reatividade apresentados pelos soros de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletados entre os anos de 2015 a 2018 soropositivos por ELISA.



### 5.5.2. Frequência de felinos soropositivos para toxoplasmose de acordo com sexo e faixa etária

Entre os felinos sororreagentes pela RIFI, 21,5% (23/107) correspondiam a fêmeas e 17,6% (18/102) machos. Já entre os positivos no ELISA, 25,2% (27/107) eram fêmeas e 16,7% (17/102) machos. (Tabela 8). Entre os reagentes pela RIFI, 11,0% (7/64) correspondiam a felinos não adultos e 23,5% (34/145) eram adultos. Entre os animais positivos por ELISA, 11% (7/64) eram não adultos e 25,5% (37/145) eram adultos (Tabela 8).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o sexo dos felinos e a positividade por RIFI ( $p=0,2998$ ) ou ELISA ( $p=0,0883$ ). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a faixa etária dos felinos e a positividade por RIFI ( $p=0,0247$ ) ou ELISA ( $p=0,0114$ ), sendo que os animais adultos apresentavam maior índice de positividade em ambos os testes (Tabela 8).

**Tabela 8.** Prevalência de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG soropositivos nos testes sorológicos de acordo com sexo e faixa etária.

Variável		Amostras examinadas		Amostras positivas			
				RIFI		ELISA	
		n	%	n	%	n	%
Sexo	Fêmea	107	51,2	23	21,5	27	25,2
	Macho	102	48,8	18	17,6	17	16,7
Faixa* etária	Não adulto	64	30,6	7	10,9	7	10,9
	Adulto	145	69,4	34	23,5	37	25,5
Total		209	100	41	19,6	44	21,0

\* $p=0,0247$  para RIFI (Adulto);  $p=0,0114$  para ELISA (Adulto).

### 5.5.3. Comparação dos testes RIFI X ELISA

Para verificar a concordância entre as técnicas de RIFI e ELISA foi utilizado o índice *Kappa*, o qual a apresentou o valor de 0,92, indicando uma ótima concordância entres os dois testes. Na tabela 9 são apresentados os resultados da avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, concordância observada, índice *Kappa*, valor preditivo positivo e negativo do teste de ELISA em relação à RIFI.

**Tabela 9.** Resultados da análise da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, precisão de diagnóstico, índice *Kappa*, valor preditivo positivo e negativo do teste ELISA utilizando como teste padrão ouro a RIFI (1:16) em 209 amostras de soro de gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG coletadas entre os anos de 2015 a 2018.

		<b>RIFI</b>		
		<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>
<b>ELISA</b>	<b>Positivos</b>	40	4	44
	<b>Negativos</b>	1	164	165
	<b>Total</b>	41	168	209
		<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>	<b>IC 95%</b>
Sensibilidade			97,5	87,4 – 99,5
Especificidade			97,6%	94,0 – 99,0
Razão de verossimilhança (positivo)			40,9	5,0 – 66,97
Razão de verossimilhança (negativo)			0,02	0,003 – 0,17
Precisão de Diagnóstico			97,6%	94,5 – 98,9
Índice <i>Kappa</i>			0,92	0,79 – 1,0
Valor Preditivo Positivo			90,9%	78,8 – 96,4
Valor Preditivo Negativo			99,3%	96,6 – 99,8



#### **5.5.4. Avidéz de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii***

Para esta avaliação foram utilizados soros de 41 gatos que tiveram o IR maior ou igual a 1,0 no ELISA tradicional. Foram encontrados 82,9% (34/41) soros com anticorpos IgG de alta avidéz e 17,1% (7/41) com anticorpos IgG de baixa avidéz.

Ao tomar como referência o número total de soros analisados (209), observou-se que 16,2% dos gatos se encontravam na fase crônica da infecção enquanto 3,3% estavam provavelmente fase aguda da toxoplasmose.

A associação da avidéz de anticorpos da classe IgG anti- *T. gondii* com as variáveis sexo e faixa etária foi calculada por teste Exato de Fisher, sendo que não foi observada associação estatisticamente significativa entre a avidéz e o sexo dos animais ( $p= 0,0675$ ) bem como entre avidéz e a categoria de faixa etária do animal. ( $p= 0,3419$ )

#### **5.6. Coinfecções e exposição a múltiplos patógenos**

De forma geral, 89% (186/209) dos gatos apresentaram evidência de exposição/ infecção para dois ou mais patógenos pesquisado. As combinações mais comuns entre dois agentes foram para: *A. platys* + *T. evansi* (19/186); soropositividade para *T. gondii* + *A. platys* (18/186); *A. platys* + CMhm (18/186); *T. evansi* + CMhm (15/186) e *T. gondii* + CMhm (9/186). Combinações entre três ou mais agentes foram encontradas em 14 animais (Tabela 10).

**Tabela 10.** Combinação de soropositividade e/ou infecção mais observadas nos gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais durante o período de 2015 a 2018.

Combinação de soropositividade e/ou infecção	n° de animais (%)
	N= 186
<i>A. platys</i> + <i>T. evansi</i>	19 (10,2)
<i>A. platys</i> + CMhm	18 (9,7)
<i>T. gondii</i> + <i>A. platys</i>	18 (9,7)
<i>T. evansi</i> + CMhm	15 (8,1)
<i>T. gondii</i> + CMhm	9 (4,8)
<i>T. evansi</i> + <i>A. platys</i> + CMhm	8 (4,3)
<i>T. evansi</i> + <i>A.platys</i> + CMt	2 (1,1)
<i>Cytauxzoon felis</i> + <i>T. evansi</i> + <i>A.platys</i>	2 (1,1)
<i>Cytauxzoon felis</i> + <i>T. evansi</i> + <i>A.platys</i> + CMhm	1 (0,5)
<i>T. evansi</i> + <i>A.platys</i> + Mhf+ CMhm	1 (0,5)

N– total de amostras que apresentaram combinação de exposição e/ou infecção. n– número de animais positivos.  
(%) percentual de animais positivos

## 6. DISCUSSÃO

Considerando a localização do PqMARG na região central da capital Belo Horizonte e sua proximidade com estabelecimentos de saúde e comerciais que levam a um grande fluxo de pessoas na região, além de ser uma importante área de lazer para os belo-horizontinos, turistas de diversas partes do Brasil e de outros países, estudos de monitoramento de patógenos, tanto virais, bacterianos, fúngicos e parasitoses em animais que habitam o espaço são de suma importância na contribuição de informações relevantes sobre a pressão de potenciais infecções para a população humana (BANETH, 2014; OTRANTO, 2018).

O trabalho de Carvalho (2018) auxiliou no entendimento sobre a dinâmica da população felina que vive dentro dos limites do PqMARG. De acordo com a primeira estimativa populacional realizada no ano de 2016, o PqMARG contava com aproximadamente 149 gatos e, em 2017, 228 animais foram estimados (Carvalho, 2018).

No total, este trabalho analisou amostras de 237 gatos provenientes do PqMARG que foram colhidas entre os anos de 2015 e 2018. O baixo número de amostras recebidas em 2015 se justifica pelo fato de que a coleta de amostras para o levantamento sanitário dos animais se iniciou no mês de dezembro do ano em questão. Já em 2018, o número de amostras recebidas também foi menor devido ao encerramento dos envios a partir do mês de fevereiro. O número de gatos classificados como não adultos representou 32,5% do total de amostras analisadas, enquanto gatos adultos, 67,5%. Segundo Carvalho (2018), a partir do mês de junho de 2016 foi firmado um acordo entre a PBH e os protetores que atuavam no PqMARG para que não houvesse o recolhimento de gatos que ainda não tivessem atingido idade adequada (> 4 meses) para a realização do procedimento de esterilização pelos médicos veterinários do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, o que pode explicar o baixo número de amostras provenientes de gatos não adultos. Já o constante recolhimento de gatos adultos pode ser consequência da entrada recorrente de novos animais no parque, principalmente devido ao abandono (CARVALHO, 2018).

Em relação ao local de recolhimento dos gatos que tiveram amostras coletadas, observou-se que os maiores pontos de captura foram próximos a portaria da rua Carandaí, Administração, Orquidário, Coreto e Academia, fato também constatado por Carvalho (2018), a qual considera que os pontos de maior recolhimento são aqueles próximos a pontos de alimentação fornecidos por protetores das Organizações da Sociedade Civil (OSCs) e, também são locais próximos às entradas do parque, o que poderia facilitar o abandono.

Considerando esta estimativa e o número de materiais recebidos em nosso laboratório, o nível de infestação por ectoparasitos no presente estudo foi considerada baixa, apenas 13,9%. Por outro lado, Ferreira et al., (2010) encontraram uma prevalência de 62,7% de ectoparasitismo por pulgas (*C. felis felis*), ácaros (*Lynxacarus radovskyi* e *Notoedres cati*) e piolhos (*Felicola subrostratus*) em um estudo onde foram avaliados 432 gatos domiciliados com histórico de acesso à rua e errantes na cidade de João Pessoa- PB, Brasil. Resultado semelhante também foi obtido por Mendes-de-Almeida et al., (2010) que entre os 292 gatos domiciliados com acesso à rua avaliados, 65% destes apresentavam algum ectoparasito, entre eles: *C. felis felis*, *Otodectes cynotis*, *Felicola subrostratus* e *Lynxacarus radovskyi*. Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo foi relatado em gatos domiciliados do município de Lages, SC, Brasil, no qual, 13,8% dos animais se encontravam infestados por pulicideos, sendo que a baixa prevalência encontrada pode ser devido ao fato da maioria dos gatos amostrados recebiam tratamento profilático ectoparasiticida de seus tutores (STALLIVIERE et al., 2009).

A baixa prevalência observada neste trabalho pode ter como prováveis motivos a não realização de uma inspeção minuciosa para coleta de ectoparasitos ou devido ao fato da presença constante de protetores e ONGs da causa animal no parque que podem fazer o uso de ectoparasiticidas naqueles animais que são encontrados intensamente parasitados.

O predomínio da *C. felis felis* (95,1%) entre os ectoparasitos identificados vai de encontro ao que também foi verificado por Thomas et al., (2016) ao avaliar 322 gatos não domiciliados nos EUA sendo que 97,2% dos pulicideos coletados eram *C. felis felis*. Apesar de prevalências menores ao encontrado no presente trabalho, *C. felis felis* também foi a espécie mais encontrada em gatos domiciliados e semi-domiciliados no Rio de Janeiro (60%) e gatos errantes em Jerusalém (54,7%) (MENDES-DE ALMEIDA et al., 2010; SALANT et al., 2013).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o ectoparasitismo de acordo com o sexo e a faixa etária dos animais. Em relação ao sexo, o mesmo foi observado por Mendes-de Almeida et al. (2010), que entre os 47% gatos fêmeas e 18% machos ectoparasitados também não houve diferença estatisticamente significativa. Em relação a faixa etária, Salant et al. (2013) indicaram que gatos filhotes com idade  $\leq 6$  meses foram significativamente mais infestados por pulgas em relação a gatos com idade  $\geq 6$  meses, resultado que os autores justificam pela menor capacidade de gatos muito jovens realizarem a autolimpeza de forma efetiva. Provavelmente, no presente trabalho não foi possível observar diferenças significativas em relação à faixa etária pelo fato de poucos animais filhotes terem

sido capturados, devido ao motivo anteriormente citado.

Duas pulgas *C. canis* (3.3%) também foram encontradas. Baixa prevalência desta espécie também foi constatada por Stalliviere et al. (2009) com apenas 0,5% dos gatos infestados. Segundo Linardi & Nagem (1973), a distribuição das espécies *C. felis felis* e *C. canis*, pode estar relacionada a fatores climáticos, sendo que a ocorrência de *C. canis* pode estar associada a climas mais frios.

As espécies de pulgas encontradas neste trabalho são as mais comuns, apresentam distribuição cosmopolita e registros em toda América Latina. Ambas podem ser encontradas em uma mesma região geográfica, porém, a *C. felis felis*, por possuir maior capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros, se estabeleceu em áreas mais extensas e por isso possui maior importância na transmissão de patógenos, tanto em cães como em gatos (LINARDI & SANTOS, 2012).

As pulgas *C. felis felis* podem desempenhar diferentes papéis na ecologia e transmissão de patógenos zoonóticos. No caso da *Rickettsia typhi*, envolvida na tifo murina, as pulgas se comportam como vetor biológico da bactéria, a qual pode ser mantida naturalmente dentro da população de pulgas de forma vertical e a transmissão acontece de forma direta através da picada da pulga infectada. (WEDINCAMP & FOIL, 2002). Já no caso da *Bartonella henselae*, envolvida na doença da arranhadura do gato, as pulgas atuam como vetores mecânicos, pois aparentemente, a bactéria fica restrita ao seu lúmen intestinal. A transmissão ocorre indiretamente pela inoculação das fezes de pulgas infectadas através de abrasões na pele (FOIL, et al., 1998). Além disso, Vobis et al. (2005) descreveram a transmissão *in vitro* do vírus da leucemia felina através da picada de pulgas.

Foram encontrados oito espécimes de piolhos da ordem Mallophaga (piolhos mastigadores), espécie *Felicola subrostratus*, a qual é considerada por ser a única espécie-específica de gatos (BOWMAN et al, 2009). No Brasil, o ectoparasitismo em gatos por *F. subrostratus* é relativamente frequente, já que sua distribuição está relacionada as áreas de clima tropical (ROMEIRO et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; MENDES-DE ALMEIDA et al., 2011). Altas infestações de piolho geralmente são encontradas em gatos debilitados, uma vez que a capacidade de realizar a limpeza dos pelos adequadamente fica comprometida. A presença destes ectoparasitos pode causar prurido intenso, alopecia, escoriações e automutilação no animal (BOWMAN et al., 2009). Não foi verificada a infestação por carrapatos e ácaros nos animais avaliados. A coleta de raspados de pele, pelos e suabes de ouvido, que não foram realizadas no presente estudo, poderiam ter contribuído para obtenção de uma maior diversidade de ectoparasitos.

No Brasil, a principal espécie que ocorre em animais de companhia, e de maior importância em cães, é o *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, o qual não possui os gatos como hospedeiros preferenciais, sendo que esses funcionam geralmente como hospedeiros acidentais do artrópode (LABRUNA & PEREIRA, 2001). *Rhipicephalus sanguineus* s. l. já foi relatado em gatos no Brasil, porém apresentando frequências baixas de 1,6% (FERREIRA et al., 2010) e 1,4% (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2011). Braga et al. (2017) relataram a primeira infecção mútua por *Ehrlichia* spp. (similaridade genética com *E. canis*) entre um gato doméstico domiciliado e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s. l. removido deste animal, reforçando o questionamento sobre qual seria a importância dos gatos como reservatórios de *E. canis* e também sobre a posição destes animais no ciclo de transmissão de carrapatos entre cães e gatos. Porém, os autores questionam também se a presença da *Ehrlichia* no carrapato poderia ser resultante da espoliação no gato infectado ou, a infecção foi transmitida ao gato através da picada do carrapato infectado, sendo que mais estudos são necessários para elucidar o *status* do gato na epidemiologia da *E. canis* (BRAGA et al., 2017).

A baixa frequência de carrapatos em gatos pode estar relacionada, além do fato de não serem os hospedeiros preferenciais, ao hábito de higienização dos gatos, o que leva à remoção dos ectoparasitos, a não ser que estes estejam fixados em uma região do corpo de difícil acesso para o animal, como é o caso da cabeça. (SILVA et al., 2007). Para Thomas et al. (2016), a carga de carrapatos encontrada em gatos pode ser subestimada, já que em seu estudo, dos 68 gatos infestados por carrapatos, 54,7% encontravam-se nos estágios imaturos (larva ou ninfa) e que, por apresentarem dimensões muito reduzidas há maior dificuldade de serem visualizados pelos proprietários e também por veterinários que não estão habituados a uma inspeção mais minuciosa.

Com exceção dos micoplasmas hemotrópicos, trabalhos sobre a ocorrência de patógenos transmitidos por vetores em felinos ainda são escassos no Brasil. Estudos prévios, assim como o presente trabalho, reforçam a existência de circulação destes agentes em felinos e a maior suscetibilidade de gatos errantes e semi-domiciliados à exposição por ectoparasitos e aos patógenos que eles transmitem (LOBETTI & LAPPIN, 2012; SILAGHI et al., 2014; ANDRÉ et al., 2017; PERSICHETTI et al., 2018). O uso de técnicas de biologia molecular contribuiu de maneira significativa para a descrição de novas espécies ou cepas de patógenos e, conseqüentemente, forneceu maiores perspectivas para estudos que envolvem infecções não tão exploradas na medicina felina (ALLISON & LITTLE, 2013).

Os diagnósticos esporádicos nessa espécie animal podem ser devido a fatores como a falta de conhecimento de agentes transmitidos por carrapatos, já que não são tão difundidos

para felinos como é para os cães, o que leva a serem subdiagnosticados, possibilidade de patogenicidade reduzida dos agentes em comparação com outras espécies, remoção rápida dos carrapatos devido ao hábito de limpeza dos felinos, que pode resultar na diminuição da oportunidade de transmissão e a falta ou negligência de diagnósticos confiáveis que levem à confirmação dos casos (BREITSCHWERDT et al., 2002).

Ao considerar o diagnóstico citológico, lâminas de sete animais (14%) apresentaram estruturas sugestivas de *A. platys*, sendo que destas, quatro (8%) tiveram resultado positivo na PCR utilizando alvos específicos. Resultado semelhante foi descrito por Correa et al., (2011) observaram menos de 1% de inclusões plaquetárias ao analisar lâminas de esfregaços de 91 gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Considerando que 37,3% (78/209) dos gatos foram positivos no teste molecular específico para *A. platys*, o método de diagnóstico por esfregaços sanguíneos é considerado de baixa sensibilidade e seu uso pode ser bastante desafiador. Precipitados de corante, corpúsculo de Howell-Jolly e outros artefatos podem ser facilmente confundidos gerando resultados falso-positivos. Além disso, no caso de suspeita de micoplasmas hemotrópicos, a presença de anticoagulantes como EDTA e heparina pode causar o desprendimento do hemoplasma dos eritrócitos com o passar do tempo (TASKER et al., 2003; TASKER, 2010). A fase da infecção também é outro fator que pode influenciar na sensibilidade do exame, sendo que na fase crônica, formas parasitárias são raras e mais difíceis de serem detectadas (ALLISON & LITTLE, 2013).

Um animal apresentou estrutura intraeritrocitária característica da fase de merozoítos, típica de piroplasmídeos, porém, este mesmo animal não teve resultado molecular positivo na PCR genérica para organismos da ordem Piroplasmida e nem na PCR específica para a espécie *C. felis*. A baixa parasitemia, sequestro do patógeno para outros tecidos e até mesmo uma limitação da técnica utilizada podem ser consequências da não detecção molecular (PERSICHETTI et al., 2018). Nenhuma lâmina apresentou inclusões basofílicas em células da linhagem leucocitária sugestivas de outros agentes riquetsiais. (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp.)

Na PCR genérica para organismos da ordem Piroplasmida, foram detectados 27,9% (58/209) animais positivos, sendo que destes, cinco (2,4%) foram positivos para a reação utilizando alvo específicos para *C. felis*. Apesar de considerada fatal para gatos domésticos, a cytauxzoonose já foi detectada em gatos domésticos assintomáticos naturalmente infectados, o que levantou a hipótese destes animais poderem se comportar como possíveis reservatórios.

Foi constatado também que os animais podem persistir com o patógeno por tempo indeterminado. (MEINKOTH et al., 2000; HABER et al., 2007; BROWN et al., 2008).

Apesar da maioria dos relatos da infecção por *C. felis* ocorrerem nos EUA, mesmo em regiões consideradas endêmicas no país, as taxas de prevalências podem ser muito variáveis, como é o caso do que foi reportado por Brown et al. (2010) que encontraram 28% em gatos ferais nos estados de Arkansas e Geórgia. Por outro lado, Rizzi et al. (2015), reportaram somente 6% em gatos domésticos saudáveis de áreas endêmicas dos estados do Oklahoma, Missouri e Arkansas. Acredita-se que o número de casos em gatos possa estar relacionado com a expansão do vetor *Amblyomma americanum*, que por sua vez está relacionado com a expansão da população do seu hospedeiro preferencial, os cervos-da-cauda-branca. No Brasil, os relatos são geralmente esporádicos, sendo que o primeiro diagnóstico molecular baseado no gene 18S rRNA foi em dois felídeos silvestres [uma onça-pintada (*Panthera onca*) e um gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*)] mantidos em um zoológico, e que apresentaram 99% de similaridade com *C. felis* após sequenciamento nucleotídico (PEIXOTO et al., 2007). Maia et al. (2013) fizeram o primeiro relato de infecção por *C. felis* em um gato doméstico domiciliado que apresentava coinfeção com ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ com desidratação, anorexia, prostração e vômito.

Considerando a detecção deste patógeno, no presente trabalho fica evidente a necessidade de mais estudos sobre a circulação de *Cytauxzoon* spp., incluindo *C. felis*, tanto em felinos silvestres como domésticos, além de trabalhos que auxiliem na descoberta de potenciais vetores e reservatórios naturais, já que ainda não se conhece qual vetor pode ser o responsável pela transmissão no Brasil. Quatro amostras foram enviadas para sequenciamento nucleotídico com a finalidade de confirmar o diagnóstico para o patógeno em questão, porém, não houve sucesso.

Infelizmente não foi possível obter a confirmação do resultado para sete amostras positivas na PCR genérica para representantes da ordem Piroplasmida através do sequenciamento nucleotídico. É importante ressaltar que os iniciadores utilizados nesta reação possuem como alvo sequência parcial do gene 18S rRNA, região considerada estável entre piroplasmídeos próximos filogeneticamente, incluindo, além do *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* spp., além de ser capaz de detectar outros membros do filo Apicomplexa, como *Sarcocystis* e *Hepatozoon* (ZÄHLER et al., 2000; SILVEIRA et al., 2011). Novas tentativas de sequenciamento nucleotídico serão futuramente realizadas. A utilização de iniciadores específicos para diferentes alvos moleculares também será considerada.



Poucos também são os relatos de infecção pelo protozoário *T. evansi* em gatos, sendo que este é o primeiro trabalho a relatar gatos domésticos naturalmente infectados pelo agente na cidade de Belo Horizonte, MG, Brasil. A detecção molecular em 54 (25,8%) animais pode ser considerada representativa e importante já que, até então, a região não é considerada endêmica para o agente. O principal mecanismo de transmissão de *T. evansi* nas Américas ocorre de maneira mecânica através de moscas hematófagas, embora a transmissão por via oral possa ser importante principalmente para animais carnívoros. Gatos, assim como os demais felídeos possuem aguçado comportamento de caça e a ingestão de presas infectadas, como roedores, gambás (marsupiais) e morcegos, os quais já foram reconhecidos como reservatórios do agente (HOARE, 1965), pode ser uma das formas de aquisição do protozoário pelos gatos (DESQUESNESS, 2004).

Em 2010, Nunes et al. (2012) detectaram, através de PCR, dois cavalos positivos para *T. evansi* em uma fazenda localizada no município de Itabira, MG. Os autores sugerem que o patógeno tenha sido introduzido após aquisição de um equino proveniente de uma região endêmica do sul do Brasil. Recentemente, quatis (*Nasua nasua*) do Parque das Mangabeiras, também localizado também na cidade de Belo Horizonte, MG, tiveram o protozoário detectado molecularmente (ESTEVAM et al., 2020). Na região do Pantanal, os quatis já são reconhecidos como reservatórios do agente, junto às capivaras (HERRERA et al, 2004). Estes achados no estado de Minas Gerais levantam a hipótese de que a circulação de *T. evansi* está ocorrendo, porém ainda são necessários mais estudos epidemiológicos com a realização de ações de vigilância e monitoramento do agente tanto em animais silvestres como domésticos afim de esclarecer se o estado de Minas Gerais ainda pode ser considerado como não endêmico, já que se trata de uma doença de notificação de acordo com o Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2019). Como não houve sucesso no sequenciamento nucleotídico, novas tentativas serão realizadas futuramente para que se obtenha melhor caracterização do agente detectado.

Felinos são frequentemente acometidos por espécies de micoplasmas hemotrópicos. Segundo Tasker (2010) até 10% dos gatos considerados saudáveis podem estar infectados com hemoplasmas felinos a qualquer momento de sua vida, além destes poderem se comportar como portadores crônicos, sendo que um resultado de PCR positivo nem sempre está correlacionada com a presença de doença clínica hemoplasmática.

Tal fato pode explicar a alta prevalência de micoplasmas encontrada nos gatos do PqMARG (48,8%), os quais foram considerados clinicamente saudáveis apesar de exames hematológicos não terem sido realizados. No Brasil, estudos anteriores reportaram

prevalências variadas de acordo com os estados onde foram realizados como São Paulo (32%) (ANDRÉ et al., 2014), Rio Grande do Sul (21,3%) (SANTOS et al., 2009), Distrito Federal (13,8%) (AQUINO et al., 2014) e Maranhão (12%) (BRAGA et al., 2012).

A espécie '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (CMhm) foi a mais frequente (18,7%), seguido pelo *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) (4,3%) e por último '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (CMt), com menos de 1% de gatos infectados. Apesar das taxas de prevalências serem variáveis entre as diferentes regiões geográficas ao redor do mundo, na maioria dos estudos, CMhm tem sido o micoplasma mais relatado enquanto que Mhf e CMt os menos frequentes, como também foi observado por Willi et al. (2006) ao avaliarem 716 gatos domiciliados doentes e/ou saudáveis com taxa de infecção de 8,7% para CMhm, 2,3% para Mhf e 0,2% para CMt. Sykes et al. (2008), ao avaliarem amostras de 310 gatos com suspeita de hemoplasmose, obtiveram uma taxa de prevalência de 23,2% para CMhm, porém a infecção por CMt foi observada em 6,5% dos animais, enquanto que Mhf em 4,8%. No Brasil, Braga et al. (2012), ao avaliarem 200 amostras de gatos semi-domiciliados clinicamente saudáveis na cidade de São Luís, MA, Brasil, detectaram através de PCR, 20 animais (10%) positivos para CMhm, cinco (2,5%) para Mhf e quatro para CMt, também utilizando iniciadores baseados no gene 16S rRNA.

Seis animais (2,9%) apresentaram coinfeção entre CMhm e Mhf. De forma similar, Braga et al. (2012) encontraram 5/200 (2,5%) gatos do município de São Luís, MA também coinfectados por essas espécies. Coinfeção por Mhf e CMt foi detectada em um (0,5%) animal. Resultado semelhante foi obtido por Aquino et al. (2014), com 2/432 (0,4%) dos gatos coinfectados pelas duas espécies em um levantamento realizado em Brasília, DF, com animais provenientes do atendimento no hospital veterinário e clínicas particulares, abrigos e ferais. A coinfeção entre mais de uma espécie de micoplasma pode ocorrer uma vez que não ocorre imunidade cruzada entre elas, porém estudos experimentais têm demonstrado que pode ocorrer imunidade protetora contra a reexposição para CMt e Mhf (NOVACCO et al., 2012; HICKS et al., 2015).

Como citado anteriormente, Mhf é reconhecida como a mais patogênica e frequentemente está associada por causar quadros de anemia hemolítica durante a fase aguda da infecção (TASKER, 2010; BARKER, 2019). Trabalhos de infecção experimental demonstraram que a infecção mista por CMhm e Mhf levavam gatos a desenvolverem doença clínica mais significativa do que a infecção por somente uma das espécies. Também já foi relatado que a coinfeção com os vírus FIV ou FeLV podem agravar os sinais clínicos (WESTFALL et al., 2001; GEORGE et al., 2002). Os gatos avaliados neste trabalho foram considerados

cl clinicamente saudáveis e a avaliação de infecção por FIV/ FeLV assim como exames de parâmetros hematológicos e bioquímicos não foram realizados durante os anos das coletas (2015 a 2018).

Foi encontrada associação estatisticamente significativa para infecção por Mhf em relação ao animal ser macho e adulto, assim como também foi relatado anteriormente por Willi et al., (2006) e Sykes et al., (2008). Tal fato reforça ainda mais a hipótese de que a rota de transmissão horizontal por contato direto possa ser mais importante nesses animais do que através da picada de pulgas (TASKER, 2010; SILAGHI et al, 2014).

Os gatos não são conhecidos até o momento por servir como hospedeiro reservatório para qualquer agente da família Anaplasmataceae. Os patógenos são mantidos em ciclos naturais no ambiente e os gatos aparentemente são infectados quando acometidos por carrapatos infectados, principalmente se a região for considerada endêmica tanto para o vetor quanto para o agente etiológico (DRYDEN et al., 2004). A ocorrência de gatos infectados por *A. platys* vem sendo recentemente documentada na literatura, porém os dados obtidos ainda são insuficientes para que se compreenda qual a importância dos felinos na cadeia epidemiológica deste agente. No presente estudo, *A. platys* representou a maior frequência (37,3%) entre os agentes Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas. Resultado semelhante foi encontrado por Zobba et al., (2015), que obtiveram uma frequência de 31,1% em 45 gatos avaliados oriundos do atendimento em hospital veterinário. No Brasil, Correa et al., 2011, detectaram DNA de *A. platys* em 13,18% dos 91 gatos amostrados. Pinto et al., 2018, ao avaliarem amostras de 60 gatos também atendidos em hospital veterinário, encontraram uma frequência de 20%. Estes dados sugerem que a infecção por *A. platys* possa ser subdiagnosticada em felinos, já que pesquisas apontam que a infecção possa ter caráter brando ou até mesmo assintomática nesses animais (HARVEY, 2006; GAUNT et al., 2010). Até o momento, não se sabe qual vetor pode ser o responsável pela transmissão, porém um estudo recente demonstrou que carrapatos *R. sanguineus* sensu stricto são capazes de transmitir o agente de forma eficaz (SNELLGROOVE et al., 2020).

Nenhuma amostra foi positiva por PCR específico de *A. phagocytophilum*, porém, considerando que o agente já foi detectado em carrapatos *A. cajennense* e *R. sanguineus* coletados de cães domésticos (SANTOS et al., 2013) e relatos de cães residentes da cidade de Belo Horizonte, MG, que tiveram DNA de *A. phagocytophilum* detectado molecularmente (SILVEIRA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017), é importante que se prossigam com trabalhos de monitoramento, assim como a investigação dos prováveis vetores reservatórios.

Amostras positivas foram detectadas no PCR genérico para agentes Anaplasmataceae de agranulócitos (44/209) tendo como alvo o gene 16S rRNA, porém, em nenhuma obteve-se sucesso no sequenciamento nucleotídico. Da mesma forma para os demais resultados inconclusivos, novas tentativas de sequenciamento nucleotídico serão futuramente realizadas, além de considerar o uso de iniciadores específicos para outros alvos moleculares, já que em Minas Gerais já foi relatada a ocorrência de *E. chafeensis* em cervídeos brasileiros (SILVEIRA et al., 2011).

Nenhum animal teve DNA de *E. canis* detectado neste trabalho ao utilizar iniciadores específicos. O mesmo resultado foi encontrado por André et al. (2014) e Malheiros et al. (2016). A ausência do patógeno no sangue periférico devido ao sequestro destes por tecidos como baço e linfóide, que geralmente ocorre durante as fases subclínicas ou crônicas da doença, podem explicar o resultado negativo. Além disso, limitações da técnica utilizada também podem ser considerados.

Por outro lado, trabalhos onde houve detecção de *Ehrlichia* spp. em gatos utilizando *nested* PCR para o alvo 16S rRNA e com similaridade para *Ehrlichia canis* apresentaram taxa de positividade de apenas 1% (2/200) em gatos do estado do Maranhão (BRAGA et al., 2012) e 1,4% em gatos domiciliados e atendidos em clínicas particulares do estado do Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2019).

Em relação a ausência de associação estatisticamente significativa entre a infestação por ectoparasitos e os resultados obtidos pelas PCRs para os hemopatógenos pesquisados, tal resultado pode ter sido em decorrência do baixo número de animais que tiveram ectoparasitos coletados/encontrados.

Apesar dos métodos moleculares auxiliarem nos diagnósticos de hemopatógenos, as inferências sobre a identificação dos agentes que circulam em gatos devem ser feitas de maneira criteriosa, principalmente para aqueles que ainda não possuem a cadeia de transmissão totalmente conhecida. Tais análises moleculares são importantes para elucidar se estes agentes, que estão circulando, possam se tratar de espécies novas ou já descritas ou possam representar subespécies ou cepas. O isolamento em culturas, no caso dos agentes riquetsiais, é essencial em processos que envolvem a descrição completa e caracterização de organismos em amostras clínicas, porém, para espécies como *A. platys*, o sucesso em cultivo celular ainda não foi reportado na literatura (ALISSON & LITTLE, 2013).

Mais análises devem ser futuramente realizadas para obter melhor caracterização molecular destes agentes e de outros que não obtiveram resultados conclusivos para demais agentes da ordem Piroplasmida e família Anaplasmataceae.

Felídeos representam importante papel na cadeia de transmissão da toxoplasmose por se comportarem, além de hospedeiros intermediários, como os únicos hospedeiros definitivos. Sabe-se que a transmissão pode ocorrer através da ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou malcozidas e pela ingestão de alimentos, principalmente frutas e hortaliças, e água contaminados por oocistos eliminados nas fezes de felinos (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013). Apesar do felino eliminar os oocistos por um curto período de tempo, estes podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos, caso as condições climáticas sejam favoráveis. Já foi observado que gatos domésticos que vivem socialmente em grupos usualmente defecam nas chamadas “latrinas”, ou seja, áreas que foram estabelecidas pelos próprios animais para realizarem a deposição de suas fezes, o que leva a uma grande concentração de oocistos nestes locais e, portanto, a um maior risco de infecções para animais e humanos (CORBETT, 1983). Mesmo não tendo sido avaliado, é provável que os gatos do PqMARG também apresentem tal comportamento, o qual parece ser comum até para outras espécies de felídeos, portanto, o monitoramento do *T. gondii* em gatos em locais onde há grande circulação de pessoas é de suma importância do ponto de vista de saúde pública. Este é o primeiro levantamento soropidemiológico para *T. gondii* realizado nos gatos do PqMARG.

A soroprevalência encontrada nos gatos do presente estudo através da RIFI e ELISA foram respectivamente de 19,6% e 21%. Apesar da soroprevalência para *T. gondii* nesses animais em todo o mundo ser estimada em 30- 40%, muitos são os fatores que podem influenciar na ocorrência da infecção. Um dos principais influenciadores na prevalência de *T. gondii* em gatos é o estilo de vida deste, sendo que geralmente, estudos com gatos ferais e não domiciliados apresentam maiores soroprevalências devido, principalmente, ao hábito de caça desses animais, em relação à gatos domiciliados (DUBEY, 2010). Considerando o estilo de vida dos gatos do presente estudo, a prevalência encontrada foi relativamente baixa. Apesar destes animais viverem livremente no parque, há a interferência humana, a qual frequentemente disponibiliza direta ou indiretamente alimentos a esses animais, o que pode fazer com que os felinos residentes no parque não precisem caçar para se alimentarem e, conseqüentemente, deixam de ingerir presas que possam estar infectadas por cistos teciduais de *T. gondii*. Resultado semelhante foi obtido por Afonso et al., (2006), que encontraram uma prevalência de 18,6% (56/301) em uma população de gatos que habitavam parques e outros locais públicos na cidade de Lyon na França, porém, o método diagnóstico utilizado foi o Teste de Aglutinação Modificado (MAT). No Brasil, Pereira et al., (2018) encontraram uma prevalência de 18% através da RIFI (*cut off* 1:64) entre os 172 gatos não domiciliados que frequentavam condomínios no bairro Barra da Tijuca, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Por outro lado, altas prevalências 50,5% (101/200) já foram reportadas em gatos semi-domiciliados no Maranhão através da RIFI (BRAGA et al., 2012). Em Fernando de Noronha, a soroprevalência em gatos domiciliados e ferais foi de 59,3% (70/118) também obtido por RIFI (*cut off* 1:16) (COSTA et al., 2012).

Ainda não existe um consenso sobre o *cut off* ideal para diagnóstico sorológico da toxoplasmose em felinos por RIFI, oscilando entre 1:16 e 1:64 na maioria dos estudos (revisto por Dubey et al., 2020). Foi encontrada uma ótima concordância (0,92) do teste ELISA em relação a RIFI (*cut off* 1:16), o qual é considerado teste padrão para diagnóstico de toxoplasmose. Resultados semelhantes foram encontrados por Gyorke et al. (2011), os quais observaram boa concordância do teste ELISA em relação ao MAT, e Can et al. (2014), que obtiveram excelente concordância entre ELISA em relação a RIFI. Considerando estes resultados, o teste ELISA pode ser uma alternativa interessante em novos estudos de levantamento com grande número de indivíduos pelas vantagens de fornecer resultados em menor período de tempo e a leitura destes ser realizada de forma automatizada.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a faixa etária dos felinos e a positividade por RIFI ou ELISA, sendo que os animais adultos apresentaram maior índice de positividade em ambos os testes. Resultados semelhantes foram reportados por Afonso et al. (2006) e Cardia et al. (2011) com gatos errantes. Segundo Dubey (2010), a soropositividade tende a aumentar com a idade devido ao fato de que gatos mais velhos tiveram mais oportunidades de adquirir a infecção, sugerindo que a transmissão pós-natal seja a forma predominante de infecção também nos gatos do PqMARG.

Afonso et al. (2006) observaram a presença significativa de anticorpos IgG em filhotes com um mês de idade, seguido por uma diminuição na prevalência aos 3-4 meses de idade. Os autores consideram que isso corresponde ao fato da transferência de anticorpos de mães para a prole ocorrer, essencialmente através do colostro. No mesmo trabalho foi observado que a soroprevalência aumentou em gatos a partir do 5-6 meses de idade, correspondendo ao início do comportamento de exploração do território e da atividade de caça, que conseqüentemente levam a oportunidades de contato com *T. gondii*.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o sexo dos felinos e a positividade por RIFI ou ELISA. O mesmo foi constatado por Coelho et al., (2011) entre gatos errantes de áreas urbanas e rurais do município de Andradina- SP e Cardia et al. (2011) em Araçatuba-SP, o que sugere que fêmeas e machos estão igualmente suscetíveis à infecção.

Considerando que houve uma ocorrência de 3% de felinos em provável fase aguda da infecção por *T. gondii* (baixa avidéz de IgG) é sugestivo que a transmissão efetiva de *T.*

*gondii* possa ocorrer no PqMARG provavelmente pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos que possam estar presentes em animais predados pelos gatos. Até o momento, sabe-se que oocistos são pouco infectantes patogênicos para gatos (DUBEY, 2006), porém a infecção por oocistos pode ter maior importância na infecção de outros animais e de seres humanos. Dabritz et al. (2007) estimaram que a contaminação ambiental anual por oocistos eliminados nas fezes de felinos domésticos naturalmente infectados pode variar de 94 a 4.671 oocistos/m<sup>2</sup>. Portanto, estudos de soroprevalência de *T. gondii*, somados a avaliação de oocistos viáveis no solo, são ótimos como indicadores de contaminação ambiental.

Foi observado alta frequência de animais soropositivos e/ou coinfectados (89%) por dois ou mais patógenos. Outros estudos reportaram a existência de coinfeção entre diferentes agentes transmitidos por vetores em gatos (ANDRÉ et al., 2017; PERSICHETTI et al., 2018) sendo que alguns incluem também a soroprevalência para *T. gondii* assim como feito no presente trabalho (LOBETTI & LAPPIN, 2012; SILAGHI et al., 2014). Persichetti et al., (2018) compararam as taxas de coinfeção de dois ou mais agentes transmitidos por vetores entre gatos que não eram totalmente domiciliados (37,3%) e gatos totalmente domiciliados (19%) e concluíram que a exposição a ectoparasitos devido ao estilo de vida do gato somado a tratamentos ineficazes com ectoparasiticidas podem ser apontados como fatores de risco para o animal apresentar mais de um patógeno concomitantemente. Os autores consideram também que semelhanças epidemiológicas compartilhadas por alguns dos agentes transmitidos por vetores podem ser responsáveis pelas coinfeções. Porém, outros fatores como as interações patogênicas dos agentes também concorrem para se manterem no hospedeiro. Dependendo do patógeno, infecções concomitantes podem influenciar no curso clínico do animal, porém, para a maioria destes ainda não se conhece totalmente os mecanismos patogênicos envolvidos em gatos, que podem ou não apresentar alterações clínicas ou laboratoriais associados (PERSICHETTI et al., 2018).

Ainda existem muitas lacunas referente as doenças transmitidas por vetores em gatos domésticos, como o papel que estes podem desempenhar na cadeia de transmissão, ressaltando-se a importância de mais estudos uma vez mais que já foi constatado a circulação de patógenos que possam ter importância na clínica de felinos e também para saúde pública.

Além disso, sugere-se que trabalhos com abordagem em saúde única, que envolvam outros animais que coabitam o parque, incluindo artrópodes que possam ser potenciais vetores sejam futuramente postos em prática. A integração de estudos do ambiente, com a fauna ali existente e também a inserção do ser humano neste meio é de fundamental importância para auxiliar no melhor entendimento da cadeia de transmissão e riscos potenciais. Estes seriam os

primeiros passos para que sejam discutidas possíveis ações de controle e prevenção, uma vez que as doenças transmitidas por vetores possuem uma epidemiologia complexa que envolve diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados que ainda permanecem desconhecidos para diversas espécies. (DANTAS-TORRES, CHOMEL & OTRANTO, 2012).

Neste momento, as recomendações de prevenção e controle para esta problemática, estão concentradas na continuidade das seguintes ações: continuidade do controle populacional dos gatos presentes no parque; o acompanhamento das colônias; o uso de equipamentos de proteção individual para os profissionais que manejam estes animais e o treinamento dos mesmos com a finalidade de reduzir o estresse para o gato, além de evitar a ocorrência de acidentes que envolvam tanto o manipulador quanto o animal; e a conscientização da população sobre questões como o abandono e posse responsável, a qual deve ser feita de maneira continuada e abranger todas as idades e públicos.



## 7. CONCLUSÃO

A prevalência de ectoparasitismo foi considerada baixa, sendo que as espécies encontradas foram pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* e *Ctenocephalides canis* e piolhos da espécie *Felicola subrostratus*;

Através da leitura das lâminas de esfregaço sanguíneo, foi possível verificar a presença de inclusões plaquetárias basofílicas que são sugestivas da infecção por *Anaplasma platys*;

Foi detectada a presença de DNA de *Cytauxzoon felis*, *Anaplasma platys* e das três espécies de micoplasmas hemotrópicos de importância em felinos (*Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' e 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' através da PCR utilizando iniciadores para alvos específicos;

Houve a detecção molecular, através da PCR utilizando iniciadores para alvo específico, de *Trypanosoma evansi*, sendo esta a primeira descrição deste parasito em gatos naturalmente infectados de Minas Gerais;

A soropositividade para *Toxoplasma gondii* foi determinada através dos testes de RIFI e ELISA e considerada baixa para os gatos do PqMARG, sendo este o primeiro estudo de soroprevalência da toxoplasmose felina realizado no local;

Foi observado uma ótima concordância do teste ELISA em relação ao RIFI na sorologia para *T. gondii*, sendo o ELISA um teste de fácil execução, leitura automatizada e prático para levantamentos soro epidemiológicos da toxoplasmose felina;

A ocorrência de animais com anticorpos IgG anti-*T. gondii* de alta avidéz nos soros dos felinos analisados demonstrou que a maioria dos animais se encontram na fase crônica da infecção;

As associações estatisticamente significativas foram encontradas entre o sexo e faixa etária do animal e a infecção por *M. haemofelis*, sendo que os gatos machos adultos tiveram maior frequência de infecção por esse agente e faixa etária (adultos) e soropositividade para *T. gondii*.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, G. D., & FARNWORTH, M. J. **Stray cats in Auckland, New Zealand: Discovering geographic information for exploratory spatial analysis.** (2012). *Applied Geography*, 34, 230-238.
- AFONSO, E; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. **Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*).** 2006. *International Journal for Parasitology* 36 1373–1382.
- ALLISON, R. W., & LITTLE, S. E. (2013). **Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats.** *Veterinary Clinical Pathology*, 42(2), 127–144. <https://doi.org/10.1111/vcp.12040>
- ALMOSNY, N.R.P. & MASSARD C.L. **Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose.** (2002), p.14-56. *In: Ibid.* (Eds), Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. L.F. Livros, Rio de Janeiro.
- ANDRADE, M. M. C.; CARNEIRO, M.; MEDEIROS, A. D.; NETO, V. A.; VITOR, R. W.A. **Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil.** (2013). *Parasite*. 20, 20
- ANDRÉ, M. R., ADANIA, C. H., MACHADO, R. Z. et al. **Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids.** 2009. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 234–237. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.234>
- ANDRÉ, M. R., DUMLER, J. S., SCORPIO, D. G. et al. **Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores.** 2012. *Ticks Tick Borne Dis.*; 3(4): 247-253. PMID:22749737. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.002>.
- ANDRÉ, M. R., BACCARIM DENARDI, N. C., MARQUES DE SOUSA, K. C. et al. **Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil.** 2014. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(5), 545-551.
- ANDRÉ, M. R., BACCARIM DENARDI, N. C., MARQUES DE SOUSA, K. C. et al. **Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil.** 2014. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>
- ANDRÉ, M. R., HERRERA, H. M., DE JESUS FERNANDES, S. et al. (2015). **Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil.** *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(6), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>
- ANDRÉ, M. R., FILGUEIRA, K. D., CALCHI, A. C., DE SOUSA, K. C. M. et al. **Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats.** 2017. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 26(4), 525–531. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017064>
- ARAMINI, J. J., STEPHEN, C., DUBEY, J. P. et al. (1999). **Potential contamination of**

**drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts.** *Epidemiology and Infection*, 122(2), 305–315. <https://doi.org/10.1017/S0950268899002113>

ARRAGA-ALVARADO, C. M., QUROLLO, B. A., PARRA, O. C. et al. (2014). **Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), 1161–1165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>

AQUINO, L. C., HICKS, C. A. E., SCALON, M. C., LIMA, M. G. D. M., LEMOS, M. DOS S., PALUDO, G. R., HELPS, C. R., & TASKER, S. (2014). **Prevalence and phylogenetic analysis of haemoplasmas from cats infected with multiple species.** *Journal of Microbiological Methods*, 107, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.013>

ABINPET (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Mercado Pet Brasil 2019.** Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 01 mar 2020.

AZHAHANAMBI, P., JYOTHIMOL, G., GR, B., ARAVIND, M., R, R. N., LATHA, B. R., & RAMAN, M. (2018). **Evaluation of multiplex PCR assay for detection of *Babesia* spp, *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma evansi* in dogs.** *Acta Tropica*, 188(June), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.028>

BANETH, G., KENNY, M. J., ANUG, Y. et al. (2004). **Infection with a Proposed New Subspecies of *Sociaty*, 42(1), 99–105.** <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.99>

BANETH, G. (2014). **Tick-borne infections of animals and humans: A common ground.** *International Journal for Parasitology*, 44(9), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>

BARKER, E. N. (2019). **Update on Feline Hemoplasmosis.** *Veterinary Clinics of North America -Small Animal Practice*, 49(4), 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.009>

BIONDO, A. W., DOS SANTOS, A. P., GUIMARÃES, A. M. S. et al. (2009). **A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 18(3), 1–7. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01803001>

BIRKENHEUER, A. J. et al. **Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples.** *Veterinary Parasitology* 137 (2006) 144–149

BLOUIN, E. F., KOCAN, A. A., GLENN, B. L. et al. (1984). **Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermaacentor variabilis* (Say).** *Journal of Wildlife Diseases*, 20(3), 241–242. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-20.3.241>

BOLAIS, P. F., VIGNOLES, P., PEREIRA, P. F., KEIM, R. et al. (2017). ***Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper.** *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2017-8>

- BOSMAN, A. M., OOSTHUIZEN, M. C., VENTER, E. H. et al. (2013). ***Babesia lengau* associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats.** *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-128>
- BOSMAN, A. M., PENZHORN, B. L., BRAYTON, K. A. et al. (2019). **A novel *Babesia* sp. associated with clinical signs of babesiosis in domestic cats in South Africa.** *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3395-x>
- BOWMAN, D. D., HENDRIX, C. M., LINDSAY, D. S., & BARR, S. C. (2002). **Feline Clinical.** In *Molecular Medicine*.
- BOWN, K. J. et al. **High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, p. 1771–1776 Vol. 45, No. 6
- BRAGA, M. S. C. O.; ANDRÉ, M. R., JUSI, M. M. G. et al. 2012. **Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 107- 111.
- BRAGA, M. S. C. O., ANDRÉ, M. R., FRESCHI, C. R., TEIXEIRA, M. C. A., & MACHADO, R. Z. (2012). **Molecular detection of hemoplasma infection among cats from São Luís island, Maranhão, Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 569–575. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200018>
- BRAGA, I. A; TAQUES, I. I. G. G.; COSTA, I. S. O. et al. ***Ehrlichia canis* DNA in domestic cats parasitized by *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) ticks in Brazil – case report.** 2017. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 412-415. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.128222
- BREITSCHWERDT, E. B., ABRAMS-OGG, A. C. G., LAPPIN, M. R. et al. (2002). **Infection in Cats.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 642–649.
- BREITSCHWERDT, E. B., ABRAMS-OGG, A. C. G., LAPPIN, M. R. et al. (2002). **Molecular Evidence Supporting *Ehrlichia canis*-like Infection in Cats.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 642. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2002\)016<0642:mescii>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2002)016<0642:mescii>2.3.co;2)
- BROWN, HOLLY. M.; LATIMER, KENNETH S.; ERIKSON, LAURA E. et al. (2008). **Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polimerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats.** *Journal Vet. Diagn Invest.*, 20, 485–488.
- BROWN, H. M, LOCKHART, J. M, LATIMER, K. S, et al. **Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats.** *Vet Parasitol* 2010; 172: 311–316.
- BRUN, R., HECKER, H., & LUN, Z. R. (1998). ***Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: Distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review).** *Veterinary Parasitology*, 79(2), 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00146-0)

- CALIC, S. B., GALVÃO, M. A. M., BACELLAR, F. et al. **Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases.** The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. (2004). 8(3), 259-262. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702004000300011>
- CAN, H., DÖSKAYA, M., AJZENBERG, D., ÖZDEMİR, H.G. et al. 2014. **Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of Izmir, Turkey.** PLoS One 9, e104930-
- CAÑÓN-FRANCO, W. A., DE ARAÚJO, F. A. P., & GENNARI, S. M. (2013). ***Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 50(1), 50–67. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v50i1p50-67>
- CARDIA, D. F. F., CAMOSSO, L. G., NETO, L. S. et al. 2013. **Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil.** Vet. Parasitol. 197, 634-637.
- CARLI, E., TROTTA, M., CHINELLI, R., et al. ***Cytauxzoon* sp infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe.** Vet Parasitol 2012; 183: 343–352.
- CHOUDHURY, A., MISRA, K. K., & BENGAL, W. (1972). **Experimental Infection of *T. evansi* in the cat.** 672–673.
- CARVALHO, P. C. F. B. **Caracterização populacional e descrição do manejo de gatos errantes no Parque Municipal Américo Renné Gianetti, Belo Horizonte, MG.** (2018). Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária., Universidade Federal de Minas Gerais.
- CENTONZE, L.A; LEVY, J. K. **Characteristics of free-roaming cats and their caretakers.** (2002) Journal of the American Veterinary Medical Association, v.220, n.1, p.1627-1633
- CLUTTON-BROCK, J. **Natural History of Domesticated Mammals.** (1999). Second edition. Cambridge University Press, Natural History Museum.
- COCAYNE, C, G & COHN, L. A. Infecção por *Ehrlichia ewingii*/ Ehrliquiose Granulocitotrópica Canina. In: GREENE, G. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos** 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.
- COELHO, W. M. D., AMARANTE, A. F. T., APOLINÁRIO, J. C. et al. 2011. **Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil.** Parasitol. Res. 109 p.1009–1013.
- CONRADO, F.O. et al. **Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos.** Veterinary Research. 2015. 11:289.
- CORBETT, L. K. **Feeding ecology and social organization of wildcats (*Felis silvestris*) and domestic cats (*Felis catus*) in Scotland.** Feeding Ecology and Social Organization of Wildcats, 1979. (1983). 324pp.-324pp

CORREA, E. S., PALUDO, G. R., SCALON, M. C. et al. (2011). **Investigação molecular de *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(10), 899–909

COSTA, D. G; MARVULO, M. F. V; SILVA, J. S. A. et al. **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil.** J Parasitol 2012; 98(3):679-680. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2910.1>. PMID:22150091

COSTA JÚNIOR, L. M. C. et al. **Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil.** 2007. The Veterinary Journal, v. 174, n. 3, p. 673-676.

COURTNEY, J. W., KOSTELNIK, L. M., ZEIDNER, N. S., & MASSUNG, R. F. (2004). **Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*.** Journal of Clinical Microbiology, 42(7), 3164–3168.

CRIADO- FORNELIO, A. et al. **Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study.** Veterinary Microbiology 93 (2003) 307–317

DABRITZ, H. A; MILLER, M. A.; ROBERT ATWILL, E. et al. **Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden.** 2007. JAVMA, vol 231, no. 11.

DA SILVA, A. S., PIEREZAN, F., WOLKMER, P., COSTA, M. M., OLIVEIRO, C. B., TONIN, A. A., SANTURIO, J. M., LOPES, S. T. A., & MONTEIRO, S. G. (2010). **Pathological findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in cats.** Journal of Comparative Pathology, 142(2–3), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.020>

DANTAS-TORRES, F., CHOMEL, B. B., & OTRANTO, D. (2012). **Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective.** Trends in Parasitology, 28(10), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>

DE LA FUENTE, J., MASSUNG, R. F., WONG, S. J., CHU, F. K. et al (2005). **Sequence analysis of the *mSP4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains.** Journal of Clinical Microbiology, 43(3), 1309–1317. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1309-1317.2005>

DESQUESNES, M., 2004. **Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America.** CIRAD-EMVT Publication, OIE, Paris, p. 174. ISBN 92- 9044-634-X <http://www.oie.int/doc/ged/D9818.PDF>

DESQUESNES, M., DARGANTES, A., LAI, D. H., LUN, Z. R., HOLZMULLER, P., & JITTAPALAPONG, S. (2013). ***Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects.** BioMed Research International, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>

DINIZ, P. P. V., SCHWARTZ, D. S., DE MORAIS, H. S. A. & BREITSCHWERDT, E. B. **Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern**

**Brazil.** (2007). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(4), 689-697.

DINIZ & BREITSCHWERDT. **Infecção por *Anaplasma phagocytophilum*/ Anaplasmosse Granulocitotrópica Canina.** In: GREENE, G. E. *Doenças Infecciosas em Cães e Gatos* 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

DOS SANTOS, A. P., DOS SANTOS, R. P., BIONDO, A. W. et al. **Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil.** (2008). *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1922-1924.

DU, F., ZHANG, Q., YU, Q., HU, M., ZHOU, Y., & ZHAO, J. (2012). **Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China.** *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.036>

DUBEY, J. P., NAVARRO, I. T., SREEKUMAR, C. et al. (2004). ***Toxoplasma gondii* Infections in Cats from Paraná, Brazil: Seroprevalence, Tissue Distribution, and Biologic and Genetic Characterization of Isolates.** *Journal of Parasitology*, 90(4), 721–726. <https://doi.org/10.1645/ge-382r>

DUBEY, J. P., 2006. **Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts.** *Vet. Parasitol.* 140: 69–75

DUBEY, J. P. (2010). ***Toxoplasmosis of Animals and Humans*** (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.

DUBEY, J. P., CERQUEIRA-CÉZAR, C. K., MURATA, F. H. A. et al. (2020). **All about toxoplasmosis in cats: the last decade.** *Veterinary Parasitology*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109145>

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P.J. 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*.** 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.

DRYDEN, M. W; PAYNE, P. A. **Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America.** *Vet Ther.* 2004; 5(2):139–54.

ESTEVAM, L. G. T. M., FONSECA JUNIOR, A. A., SILVESTRE, B. T. et al. (2020). **Seven years of evaluation of ectoparasites and vector-borne pathogens among ring-tailed coatis in an urban park in southeastern Brazil.** *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21(July), 100442. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100442>

ELMORE, S. A., JONES, J. L., CONRAD, P. A., PATTON, S., LINDSAY, D. S., & DUBEY, J. P. (2010). ***Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention.** *Trends in Parasitology*, 26(4), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

FARNWORTH, M. J.; CAMPBELL, J. & ADAMS, N. J. **What’s in a name? Perception of stray and feral cat welfare and control in Aotearoa, New Zealand.** *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 14 (1), 59-74.

- FÁVERO, L. P & BELFIORE, P. **Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com Excel®, SPSS® e Stata®.** (2017). Elsevier. Brasil.
- FERREIRA, D. R. A., ALVES, L. C., & FAUSTINO, M. A. DA G. (2010). **Ectoparasitos de *Felis catus domesticus* (Linnaeus, 1758) na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil.** Biotemas, 23(4), 43–50. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n4p43>
- FOIL, L., ANDRESS, E., FREELAND, R.L., ROY, A.F., RUTLEDGE, R., TRICHE, P.C., O'REILLY, K.L., 1998. **Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces.** J. Med. Entomol. 35, 625–628.
- GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B. et al. **Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings.** Parasit Vectors 2010;3(1):33
- GENARO, G. (2002). **Gato doméstico: comportamento e bem-estar.** Rev. CRMV-PR, 5. 23-5.
- GEORGE, J. W., RIDEOUT, B. A., GRIFFEY, S. M., & PEDERSEN, N. C. (2002). **Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats.** American Journal of Veterinary Research, 63(8), 1172–1178. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1172>
- GERHOLD, R. W., & JESSUP, D. A. (2013). **Zoonotic Diseases Associated with Free-Roaming Cats.** *Zoonoses and Public Health*, 60(3), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01522.x>
- GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. **Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis.** 2004. *Annali dell' Instituto Superior di Sanità.* v.40. p.65-70.
- GUTIERREZ, C. N.; MARTINEZ, M., SANCHEZ, E., et al. **Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela.** *Vet Clin Pathol* 2008;37(3):258–65.
- GYÖRKE, A., OPSTEEGH, M., MIRCEAN, V. et al. 2011. ***Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors.** *Prev. Vet. Med.* 102, 321-328.
- HABER M. D, TUCKER M. D, MARR H. S, et al. **The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA.** (2007) *Vet Parasitol* 146:316–320
- HARVEY J. W. Thrombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* infection). In: Greene C. E, ed. **Infectious diseases of the dog and cat.** 3rd edition. St. Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006. p. 229–31.
- HERRERA, H.M. et al. **Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil.** *Veterinary Parasitology.* 2004. 125. 263-275.



HICKS, C.A.E, WILLI, B., RIOND, B., et al. **Protective immunity against infection with *Mycoplasma haemofelis***. Clin Vaccine Immunol 2015;22(1):108–18.

HILL, D. E., CHIRUKANDOTH, S., & DUBEY, J. P. (2005). **Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals** . *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 41–61. <https://doi.org/10.1079/ahr2005100>

HOARE, C.A., 1965. **Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes**. Acta Trop. 22, 204–216.

KAWAHARA, M. et al. ***Ehrlichia chaffeensis* infection of Sika deer, Japan**. (2009). Emerg Infect Dis 15: 1991-1999

KHUL, K. A. 1994. **Dealing with mites and their related diseases in cats**. Veterinary Medicine, 89: 1115-1121.

LABRUNA, M. B., & PEREIRA, M. C. (2001). **Ticks on dogs in Brazil**. In Clínica Veterinária (Vol. 30, pp. 24–32). <http://r1.ufrj.br/adivaldofonseca/wp-content/uploads/2014/06/Labruna-et-al-2001-carrapatos-caes-CLIN-VET.pdf>

LANDSBERG, G. (1996). **Feline behavior and welfare**. Journal of the American Veterinary Medical Association, 208(4), 502–505. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-7401-2.00002-7>

LASS, A., PIETKIEWICZ, H., MODZELEWSKA, E., DUMÈTRE, A., SZOSTAKOWSKA, B., MYJAK, P. 2009. **Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods**. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 599–605.

LAPPIN, M. R. **Update on flea and tick associated diseases of cats**. Veterinary Parasitology (2010), <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.022>

LAPPIN & BREITSCHWERDT. Infecção por *Anaplasma phagocytophilum*/Anaplasmosse Granulocitotrófica Felina. In: GREENE, G. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos** 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

LAPPIN, M. R., ELSTON, T., EVANS, L. et al (2019). **AAFP Feline Zoonoses Guidelines**. Journal of Feline Medicine and Surgery, 21(11), 1008–1021. <https://doi.org/10.1177/1098612X19880436>

LIMA, M. L. F., SOARES, P. T., RAMOS, C. A. N. et al. (2010). **Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology, 41(2), 381–385. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200019>

LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. **Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães em Belo Horizonte e municípios vizinhos**. 1973. Revista Brasileira de Biologia, v. 33, n. 4, p. 529-538.

LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. **Sifonápteros do Brasil** (2000) Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP. 291p.

LINARDI, P. M., & SANTOS, J. L. C. (2012). *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis*: (Siphonaptera: Pulicidae): **Algumas questões para identificar corretamente estas espécies**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 21(4), 345–354.

LITTLE, S. E. (2010). **Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats**. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, 40(6), 1121–1140. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>

LEPCZYK, C. A.; LOHR, C. A.; DUFFY, D. C. A. **A review of cat behavior in relation to disease risk and management options**. (2015) Applied Animal Behaviour Science. 173 (29-39)

LLORET, A., ADDIE, D. D., BOUCRAUT-BARALON, C. et al. (2015). **Cytauxzoonosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management**. Journal of Feline Medicine and Surgery, 17(7), 637–641. <https://doi.org/10.1177/1098612X15589878>

LOBETTI, R., & LAPPIN, M. R. (2012). **Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Bartonella* species and haemoplasma infection in cats in South Africa**. Journal of Feline Medicine and Surgery, 14(12), 857–862. <https://doi.org/10.1177/1098612X12452495>

MAIA, L. M. P., CERQUEIRA, A. DE M. F., DE BARROS MACIEIRA, D. et al. **Cytauxzoon felis and "Candidatus Mycoplasma haemominutum" coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*)**. (2013). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 22(2), 289–291.

MAIA, C., ALMEIDA, B., COIMBRA, M., FERNANDES, M. C. et al. (2015). **Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal**. Parasites and Vectors, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0759-8>

MACIEIRA, D. DE B., MESSICK, J. B., CERQUEIRA, A. De M. F. et al. (2005). **Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil**. Veterinary Clinical Pathology, 34(1), 44–48. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00008.x>

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

MALHEIROS, J., COSTA, M. M., DO AMARAL, R. B. et al. (2016). **Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil**. Ticks and Tick-Borne Diseases, 7(5), 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>

MALMASI, A., MOSALLANEJAD, B., MOHEBALI, M., SHARIFIAN FARD, M., & TAHERI, M. (2009). **Prevention of shedding and re-shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts in experimentally infected cats treated with oral clindamycin: A preliminary study**. Zoonoses and Public Health, 56(2), 102–104. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01174.x>

MARTINS, S. D. S., & HORIZONTE, B. (2005). **Qualidade Ambiental Urbana: Dinâmica Sócio- Ambiental De Áreas Verdes E Espaços Livres – Fundação Zoo-Botânica De Belo**

Horizonte , Parque Municipal Américo René Giannetti E Parque Municipal Das Mangabeiras – Belo Horizonte-Mg. Anais Do X Encontro de Geógrafos Da América Latina, 11371–11395.

MASSUNG, R.F. et al. **Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae.** (1998). J Clin Microbiol 36: 1090-1095.

MATOS, A. M. R. N., et al. **Antibodies anti-trypanosomatides in domestic cats in Paraná: who is at highest risk of infection?** (2018) Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 232-236

MEDINA, F. M., BONNAUD, E., VIDAL, E., NOGALES, M. **Underlying impacts of invasive cats on islands: not only a question of predation.** (2014). Biodivers Conserv 23:327-342

MEINKOTH, J., KOCAN, A. A., WHITWORTH, L. et al. **Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998).** (2000) J.Vet. Intern. Med. 14, 521-525

MEINKOTH, J. H., & KOCAN, A. A. (2005). **Feline cytauxzoonosis. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, 35(1 SPEC. ISS.), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.003>

MENDES-DE-ALMEIDA, F., CRISSIUMA, A. L., GERSHONY, L. C. et al. **Characterization of ectoparasites in an urban cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758) population of Rio de Janeiro, Brazil.** (2011). Parasitology Research, 108(6), 1431- 1435.

MESSICK, J. B. (2004). **Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential.** Veterinary Clinical Pathology, 33(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>

MILLÁN J, NARANJO V, RODRÍGUEZ A, et al. **Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequence of *Cytauxzoon* species in Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) in Spain.** Parasitology 2007; 134: 995–1001.

MINUZZI, C. E et al. **Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil.** (2020). PLoS One. Jan 30;15(1): e0228442.

MISRA, K. K., ROY, S., & CHOUDHURY, A. (2016). **Biology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in experimental heterologous mammalian hosts.** Journal of Parasitic Diseases, 40(3), 1047–1061. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0633-1>.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y. et al. **Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene.** (2006) Emerging Infectious Diseases, v. 12, n. 2, p. 326–329.

NDIP, L. M, NDIP, R. N, ESEMU, S. N, et al. **Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon.** Exp Appl Acarol 2010;50(2):163–8.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE C. E. (ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd edition. St Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006. p. 203–216.

NOVACCO, M, BORETTI, F. S, FRANCHINI, M., et al. **Protection from reinfection in "*Candidatus Mycoplasma turicensis*"-infected cats and characterization of the immune response**. *Vet Res* 2012;43(1):82.

NUNES, J. T. S., DA SILVA, A. S., DE SOUZA DORNELES, F., TONIN, A. A., LAZZAROTTO, C., MILETTI, L. C., & MONTEIRO, S. G. (2012). **Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil**. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(4), 205–207. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.08.023>

OIE (World Organisation for Animal Health). **Terrestrial Animal Health Code**. 2019. Disponível em : <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/>

OLIVEIRA, L. S., OLIVEIRA, K. A., MOURÃO, L. C. et al. (2009). **First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil**. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 2), 55–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02635.x>

OTRANTO, D. (2018). **Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control**. *Veterinary Parasitology*, 251(December 2017), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.021>

PASSOS, L. M. F., GEIGER, S. M., RIBEIRO, M. F. B., PFISTER, K., & ZÄHLER-RINDER, M. (2005). **First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil**. *Veterinary Parasitology*, 127(1), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.028>

PBH (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE), (2020). **Parque Municipal Américo Renné Giannetti**. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-zoobotanica/informacoes/parques/parque-municipal-americo-renne-giannetti>. Acesso em 01 mar 2020.

PEIXOTO, P. V., SOARES, C. O., SCOFIELD, A. et al. (2007). **Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil**. *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.023>

PENNISI, M. G., HOFMANN-LEHMANN, R., RADFORD, A. D., TASKER, S. et al. (2017). ***Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management**. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(5), 542–548. <https://doi.org/10.1177/1098612X17706462>

PENZHORN, B. L., SCHOEMAN, T., & JACOBSON, L. S. (2004). **Feline babesiosis in South Africa: A review**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 183–186. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.027>

PEREIRA, P. F; BARBOSA, A.S.; SANTOS, A.L.C.; BOLAIS, P.F.; DARDÉ, M.L.; AMENDOEIRA, M.R.R., 2018. ***Toxoplasma gondii*: infection among shelter and stray**

cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 27, 401-408.

PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C. et al **Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela.** (2006) *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1078, 110-117

PERSICHETTI, M. F., PENNISI, M. G., VULLO, A., MASUCCI, M., MIGLIAZZO, A., & SOLANO-GALLEGU, L. (2018). **Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy.** *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2725-8>

PETERS, I. R. et al. **The prevalence of three species of Feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assay.** *Veterinary Microbiology* 126 (2008) 142–150.

PINTO, A. B. T., PALUDO, G. R., GAZÊTA, G. S. et al. (2018). **Anaplasmatataceae in cats (*Felis catus*) in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(6), 1137–1150. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4753>

QUROLLO, B. A., BALAKRISHNAN, N., CANNON, C. Z., MAGGI, R. G., & BREITSCHWERDT, E. B. (2014). **Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma.** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(8), 713–720. <https://doi.org/10.1177/1098612X13519632>

RAMOS, C. A. N. et al. **Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, (2009) v. 18, supl. 1, p. 58-62

RAINA, A.K.; KUMAR, R.; RAJORA, V. S. et al. **Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice.** (1985). *Veterinary Parasitology.* 18. 67-69

REAGAN, K. L., CLARKE, L. L., HAWLEY, J. R., LIN, P., & LAPPIN, M. R. (2017). **Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*.’** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(8), 798–802. <https://doi.org/10.1177/1098612X16658317>

REICHARD, M. V, MEINKOTH, J. H, EDWARDS, A. C. et al. **Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*.** *Vet Parasitol* 2009; 161(1-2): 110-115.

RIKIHISA, Y. et al. **Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*** (1997). *Journal of Clinical Microbiology.* p. 823–829. vol. 35, no. 4

RIZZI, T. E, COHN, L. A, BIRKENHAUER, A. J, et al. **Prevalence of *Cytauxzoon felis* infection in healthy cats from enzootic areas in Arkansas, Missouri, and Oklahoma.** *Parasit Vectors* 2015; 8: 13.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J., KATTERINE BONILLA-ALDANA, D., IDARRAGA-BEDOYA, S. E. et al. (2019). **Epidemiology of zoonotic tick-borne diseases in latin america: Are we just seeing the tip of the iceberg?** F1000Research, 7, 1–20. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17649.2>

ROMEIRO, E. T, FAUSTINO, M. A. G, ALVES, L. C, SOARES, Y. M. et al. **Aspectos clínicos da infestação por *Lynxacarus radovskyi* em gatos procedentes da Região Metropolitana do Recife.** 2007. Revista Clín Vet 69:108–113

SANTARÉM, V. A., LAPOSY, C. B., & FARIAS, M. R. DE. (2005). **Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato.** Colloquium Agrariae, 1(2), 60–66. <https://doi.org/10.5747/ca.2005.v01.n2.a015>

SANTOS, A. P. DOS. (2008). **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SANTOS, H. A. et al. **Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil.** (2013). Parasites and Vectors, 6(1), 1-10.

SAINZ, A.; ROURA, X.; MIRÓ, G. et al. **Guideline for Veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe.** 2015 Parasit Vectors; 8: 75.

SALAKIJ, C.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; SALAKIJ, J. et al. **Molecular characterization of *Anaplasma platys* in a domestic cat from Thailand.** 2012. Comp. Clin. Pathol. 21, 345–348.

SALANT, H., MUMCUOGLU, K. Y., & BANETH, G. (2014). **Ectoparasites in urban stray cats in Jerusalem, Israel: Differences in infestation patterns of fleas, ticks and permanent ectoparasites.** Medical and Veterinary Entomology, 28(3), 314–318. <https://doi.org/10.1111/mve.12032>

SILAGHI, C.; KNAUS, M.; RAPTİ, D. et al. **Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania.** 2014. Parasites & Vectors, 7:62

SILVA, A. S.; DA SILVA, M. K.; MONTEIRO, S. G. et al. **Parasitismo por *Amblyomma triste* em gato doméstico** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, vol. 16, núm. 2, abril-junio, 2007, pp. 108-109

SILVEIRA, J. A. G., RABELO, É. M. L., & RIBEIRO, M. F. B. (2011). **Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil.** Veterinary Parasitology, 177(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.044>

SILVERA, J. A. G.; RABELO, E M. L.; RIBEIRO, M. F. B. **Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815).** 2011. Transboundary and Emerging Diseases. 59: 353-360.

<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01278.x>

SILVEIRA, J. A. G., RABELO, É. M. L., LACERDA, A. C. R., BORGES, P. A. L., TOMÁS, W. M., PELLEGRIN, A. O., TOMICH, R. G. P., & RIBEIRO, M. F. B. (2013). **Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil.** Ticks and Tick-Borne Diseases, 4(4), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.008>

SILVEIRA, J. A. G., VALENTE, P. C. L. G., PAES, P. R. O. et al. **The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a brazilian dog.** (2015). Ticks and Tick-borne Diseases, 6(3), 242-245.

SILVEIRA, J. A. G., REIS, I. A., ESTEVAM, L. G. T. M., PINTO, M. C. C., ZWEYGARTH, E., PASSOS, L. M. F., & PAZ, G. F. (2017). **Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil.** Pesquisa Veterinaria Brasileira, 37(9), 958–962. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000900010>

SIMKING, P., WONGNAKPHEE, S., STICH, R. W., & JITTAPALAPONG, S. (2010). **Detection of *Babesia vogeli* in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand.** Veterinary Parasitology, 173(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.025>

SIMON, J. A., KURDZIELEWICZ, S., JEANNIOT, E., DUPUIS, E. et al. (2017). **Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms.** International Journal for Parasitology, 47(6), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.004>

SHERRILL, M. K., & COHN, L. A. (2015). **Cytauxzoonosis: Diagnosis and treatment of an emerging disease.** Journal of Feline Medicine and Surgery, 17(11), 940–948. <https://doi.org/10.1177/1098612X15610681>

SHOCK B. C; MURPHY S. M; PATTON L. L. et al. **Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states.** Vet Parasitol. (2011); 175: 325-330

SLATTER, M. L. **The welfare of feral cats.** (2005). In I. Rochlitz (Ed.), The welfare of cats (pp.141e176). Dordrecht: Springer

SNELGROVE, A. N.; KRAPIUNAYA, I; FORD, S. L, S. et al. **Vector competence of *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* for *Anaplasma platys*.** Ticks Tick Borne Dis. 2020 doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101517.

SNIDER, T. A.; CONFER, A. W. & PAYTON, M. E. **Pulmonary histopathology of *Cytauxzoon felis* infections in the cat.** (2010). Vet Pathol. 698- 702.

SOARES, G. R.; OLIVEIRA, A. A. P.; SILVA, A. R. M. **Butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea) from an urban park in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil.** (2012). Biota Neotrop. 12(4).

SOBRINHO, L. S. V., ROSSI, C. N., VIDES, J. P., BRAGA, E. T. et al. (2012). **Coinfection**

of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.010>

SOLANO-GALLEGO, L., & BANETH, G. (2011). **Babesiosis in dogs and cats- Expanding parasitological and clinical spectra.** *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>

STALLIVIERE, F. M., BELLATO, V., DE SOUZA, A. P. et al. (2009). **Ectoparasitos e helmintos intestinais em *Felis catus domesticus*, da cidade de Lages, SC, Brasil e aspectos sócioeconômicos e culturais das famílias dos proprietários dos animais.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(4), 26–31. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01804005>

STATISTA. **Number of cats in the United States from 2000 to 2017.** Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/198102/cats-in-the-united-states-since-2000/>. Acesso em 01 mar 2020.

STATISTA. **Number of pet animals in European Union in 2019, by animal type.** Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/515010/pet-population-european-union-eu-by-animal/>. Acesso em 23 mai 2021.

SUARÉZ-ARANDA, F., JR, A. J. G., HIRAMOTO, R. M., & CARDOSO, R. P. A. **The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru.** (2000). *Veterinary Parasitology*. 91, 23-32.

SYKES, J. E., DRAZENOVICH, N. L., BALL, L. M., & LEUTENEGGER, C. M. (2007). **Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 685–693. <https://doi.org/10.1892/0891->

SYKES, J. E., TERRY, J. C., LINDSAY, L. L., & OWENS, S. D. (2008). **Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(3), 372–379. <https://doi.org/10.2460/javma.232.3.372>

TASKER, S., BINNS, S. H., DAY, M. J., GRUFFYDD-JONES, T. J. et al. (2003). **Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in cats in the United Kingdom.** *Veterinary Record*, 152(7), 193–198. <https://doi.org/10.1136/vr.152.7.193>

TASKER, S. (2010). **Haemotropic Mycoplasmas: What’s their real significance in cats?** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.03.011>

TAETZSCH, S. J; BERTKE, A. S.; GRUSZYNSKI, K. R **Zoonotic disease transmission associated with feral cats in a metropolitan area: a geospatial analysis.** (2018) *Zoonoses Public Health*; 65:412-419.

TARELLO, W. ***Trypanosoma evansi* infection in three cats.** (2005). *Revue de Medecine*



Veterinaire, 156(3), 133-134.

TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., & WEISS, L. M. (2000). ***Toxoplasma gondii*: From animals to humans.** International Journal for Parasitology, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

THOMAS, J. E.; STAUBUS, L.; GOOLSBY, J. L.; REICHARD, M. V., **Ectoparasites of free-roaming domestic cats in the central United States.** 2016. Veterinary Parasitology <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.034>

TORGERSON, P. R., & MACPHERSON, C. N. L. (2011). **The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends.** Veterinary Parasitology, 182(1), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.017>

TUFF, D.W. **A key to lice of man and domestic animals.** (1977). Texas J. Sci. 20: 1-4.

UILENBERG, G. (2006). **Babesia-A historical overview.** Veterinary Parasitology, 138(12),3 10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

VERONESI, F.; SANTORO, A.; MILARDI, G. L. M. et al. **Detection of *Toxoplasma gondii* in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element.** (2017). Parasitol Res. 116:1063-1069

VOBIS, M.; D’HAESE, J.; MEHLHORN, H. 2005. **Experimental quantification of the feline leukaemia virus in the cat flea (*Ctenocephalides felis*) and its faeces.** Parasitology Research, 97: S102-S106.

VOLLAIRE, M. R., RADECKI, S. V., & LAPPIN, M. R. (2005). **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States.** American Journal of Veterinary Research, 66(5), 874–877. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.874>

WAGNER J. E. **A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats.** 1976. J Am Vet Med Assoc 168:585–588.

WATANABE, M., HISASUE, M., SOUMA, T., OHSHIRO, S., YAMADA, T., & TSUCHIYA, R. (2008). **Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction.** Journal of Veterinary Medical Science, 70(10), 1095–1099. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.1095>

WEDINCAMP, J. R. J.; FOIL, L. D., 2002. **Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouche).** J. Vector. Ecol. 27, 96–101.

WESTFALL, D. S., JENSEN, W. A., REAGAN, W. J., RADECKI, S. V., & LAPPIN, M. R. (2001). **Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin.** American Journal of Veterinary Research, 62(5), 687–691. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.687>

WILLI, BARBARA, BORETTI, F. S., BAUMGARTNER, C., TASKER, S., WENGER, B., CATTORI, V., MELI, M. L., REUSCH, C. E., LUTZ, H., & HOFMANN-LEHMANN, R. (2006). **Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland.** *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961–969.

WILLI B, NOVACCO M, WOLF-JÄCKEL GA, BORETTI FS, WENGI N, LUTZ H, HOFMANN- LEHMANN R. **Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe.** 2010. *Schweiz Archiv Tierheilk*, 152:237–244.

YABSLEY, M. J, VARELA, A. S, TATE, C. M, et al. ***Ehrlichia ewingii* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).** *Emerg Infect Dis* 2002;8(7):668–71.

YABSLEY, M. J., & SHOCK, B. C. (2013). **Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs.** *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2(1), 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>

YU, D. H; LI, Y. H, YOON, J. S, et al. ***Ehrlichia chaffeensis* infection in dogs in South Korea.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8(3):355–8.

ZAHLER, M. et al. **Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs.** (2000). *Veterinary Parasitology* 89. 241–248

ZEIDNER, N.S., BURKOT, T.R., MASSUNG, R., NICHOLSON, W.L., DOLAN, M.C., RUTHERFORD, J.S., BIGGERSTAFF, B.J., MAUPIN, G.O. **Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in northern Colorado.** 2000. *J. Infect. Dis.* 182,616–619.

ZIEMAN, E. A., NIELSEN, C. K., & JIMÉNEZ, F. A. (2018). **Chronic *Cytauxzoon felis* infections in wild-caught bobcats (*Lynx rufus*).** *Veterinary Parasitology*, 252(January), 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.022>

ZOBBA, R., ANFOSSI, A. G., VISCO, S., SOTGIU, F. et al. (2015). **Cell tropism and molecular epidemiology of *Anaplasma platys*-like strains in cats.** *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(3), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.008>.

## ANEXO 1

**Anexo 1.** Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 185 / 2016, relativo ao projeto intitulado "MANEJO DE GATOS COMUNITÁRIOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", que tem como responsável Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/10/2016. Este certificado espira-se em 11/10/2021.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 185 / 2016, related to the Project entitled "CATS COMMUNITY MANAGEMENT IN MUNICIPALITY BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", under the supervision of Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/10/2016. This certificates expires in 11/10/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
 Belo Horizonte, 11/10/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## ANEXO 2

**Anexo 2.** Termo de Autorização Institucional entre Universidade Federal de Minas Gerais e Secretaria Municipal de Saúde/ Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte.



PREFEITURA MUNICIPAL  
DE BELO HORIZONTE



## TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

À Escola de Veterinária da UFMG e ao Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Campus Pampulha, localizada à Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-901.

**Responsáveis pela pesquisa:**

a) Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte

Maria Helena Franco Morais (CPF: 627451406 63),  
Vanessa de Oliveira Pires Fiúza (CPF: 652880506 78),  
Eduardo Viana Vieira Gusmão (CPF: 9892187860 53),  
Silvana Teclas Brandão (CPF: 666398246 04 )

b) Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

- Depto. Parasitologia/ICB  
Profa. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira  
Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro  
Msc. Hudson Andrade dos Santos

- Depto. de Patologia Geral  
Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri  
Prof. Dr. Ricardo Gonçalves  
Prof. Dra Tatiane Paixão  
Dr. Aldair Woyames Pinto Júnior  
Msc. Gregório Guilherme Almeida

- Depto de Virologia/ICB  
Giliane de Souza Trindade: Profa Adjunta  
Galileu Barbosa Costa: Doutorando em Microbiologia  
Jaqueline Silva de Oliveira: Mestranda em Microbiologia  
Ana Teresa Saraiva Silva: Graduanda em Biologia. IC.

- Depto. Medicina Veterinária Preventiva/EV  
Profa. Kelly Moura Keller  
Profa. Danielle Ferreira de Magalhães Soares  
Paloma Carla Fonte Boa Carvalho  
Joana Angelica Macêdo Costa Silva (Residente em Saúde Pública)  
Glendalessa Nunes Rocha de Faria Teixeira (Residente em Saúde Pública)

- Depto. Clínica e Cirurgia Veterinárias/EV  
Prof. Renato de Lima Santos  
Amanda Pifano Neto Quintal  
Diogo César Eneidino Lacerda

c) Universidade Federal de Uberlândia - UFU

- ICBIM  
Prof. Sydney Magno da Silva

## Anexo 2. Continuação.



Esta autorização refere-se à parceria firmada entre a Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte para realização do Projeto de Pesquisa "MANEJO DE GATOS COMUNITÁRIOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", que tem como objetivos específicos:


- Caracterizar os gatos comunitários analisados quanto as variáveis: espécie, sexo (macho e fêmea), idade (filhote, jovem e adulto), condição corporal, sinais clínicos específicos, diagnóstico presuntivo e o local de origem e destinação;
- Identificar agentes etiológicos potencialmente patogênicos (parasitos, vírus e bactérias) e de importância em saúde pública nos gatos comunitários estudados;
- Avaliar indicadores de bem estar animal, relacionados à dimensão sanitária e comportamental;
- Conhecer a dinâmica populacional das populações de gatos comunitários residentes em parques municipais;
- Determinar a distribuição espacial das colônias no interior das áreas públicas (parques, entre outros) e no município de Belo Horizonte, caracterizando o grau de dependência do homem e sua associação com os patógenos encontrados e características físicas e de bem estar;
- Realizar a cirurgia de esterilização nos gatos capturados (machos e fêmeas) e promover ações de adoção ou, na impossibilidade desta, retorno para o ambiente de origem;
- Avaliar os custos e os fatores facilitadores e dificultadores para a implantação do manejo de gatos comunitários em Belo Horizonte.

Autorizo a coleta de dados relativos aos animais capturados e ao ambiente em que se encontra, assim como de amostras biológicas, conforme explicitado no projeto de pesquisa acima referido.

Ciente dos objetivos e metodologia da pesquisa concordo em fornecer todos os subsídios para seu desenvolvimento, desde que, sejam assegurados os requisitos abaixo:

- Cumprimento das determinações éticas da Lei no 11.794, de 08.10.2008 do CONCEA
- Esta pesquisa será realizada em consonância com as atividades rotineiras previstas no serviço e não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação na pesquisa

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2016.

  
 Edson de Moraes Vieira Guimarães  
 Gerência de Controle de Zoonoses  
 BR 92753-2

GERÊNCIA DE CONTROLE DE ZOOBIOSEGURANÇA/MSA/PRE  
 Av. Arco-Povo, 2.584 F. 2º Andar - Funcionário  
 CEP: 30190-00 - BELO HORIZONTE, MG  
 Fone: (51) 3271-3001 - Fax: 3271-5546 - www.cogzph.gov.br