



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

**PIROPLASMÍDEOS EM GATOS DOMÉSTICOS RESIDENTES NO DISTRITO  
FEDERAL**

**DANIELA MACIEL FIGUEIREDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO DE 2017**



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

**PIROPLASMÍDEOS EM GATOS DOMÉSTICOS RESIDENTES NO DISTRITO  
FEDERAL**

**ALUNA: DANIELA MACIEL FIGUEIREDO**

**ORIENTADORA: GIANE REGINA PALUDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 194/2017**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO DE 2017**

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

**PIROPLASMÍDEOS EM GATOS DOMÉSTICOS RESIDENTES NO DISTRITO  
FEDERAL**

**DANIELA MACIEL FIGUEIREDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS  
COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADO POR:**

---

**GIANE REGINA PALUDO, Doutora (UnB)  
ORIENTADOR**

---

**ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Doutora (UnB)  
EXAMINADOR EXTERNO**

---

**DANIELI BROLO MARTINS, Doutora (UFG)  
EXAMINADOR EXTERNO**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FIGUEIREDO, D. M. **Piroplasmídeos em gatos domésticos residentes do Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 71p. Dissertação de Mestrado.

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

FIGUEIREDO, D. M. **Piroplasmídeos em gatos residentes do Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2017.

1. Piroplasmas. 2. Felinos. 3. PCR. 4. Hematologia  
5. Bioquímica

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xi
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
1.INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.1    Objetivos Gerais.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2    Objetivos Específicos.....</b>	<b>2</b>
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
<b>2.1 Considerações sobre morfologia, ciclo de vida e taxonomia.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Patogenia.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Diagnóstico.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1 Microscopia.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2 Sorologia.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Diagnóstico molecular.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Epizootiologia.....</b>	<b>12</b>
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	15
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>26</b>
1.RESUMO.....	26
2.ABSTRACT.....	28
3.INTRODUÇÃO.....	29
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
<b>4.1 Amostras.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.1 Realização de hemograma e perfis bioquímicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Extração do DNA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
5. RESULTADOS.....	36
6.DISSCUSSÃO.....	45

7.CONCLUSÃO.....	51
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

A infecção por piroplasmídeos nos felinos são consideradas doenças emergentes, relatadas no mundo todo, porém relativamente pouco estudadas. Os animais infectados com piroplasmas podem manifestar doença clínica decorrente da infecção, ou serem assintomáticos. O gene 18S rRNA tem sido o gene de eleição para detecção de piroplasmídeos em felinos, por meio de técnicas de diagnóstico molecular. O presente trabalho teve por objetivos determinar a ocorrência da infecção por piroplasmídeos nos felinos domésticos do Distrito Federal por meio da PCR, assim como identificar as possíveis alterações laboratoriais, sintomatologia clínica e também fatores de risco envolvidos nessas infecções. Foram avaliados 165 gatos domésticos (*Felis Catus*), sendo 143 provenientes de clínicas veterinárias particulares do DF e 22 provenientes de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Por meio da PCR, 30,90% dos animais testados estavam infectados por piroplasmídeos. Em relação aos achados laboratoriais não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre o grupo de animais positivos e negativos na PCR, com exceção da mensuração da uréia plasmática. A maioria dos animais positivos foi assintomática ou os animais possuíam sintomatologia não relacionada a infecção por piroplasmídeos. Esse estudo sugere que os felinos podem ser potenciais portadores assintomáticos desses microorganismos e/ou que as espécies de piroplasmas encontradas na amostragem podem ser espécies de baixa patogenicidade para os felinos domésticos.

Palavras chave: 1.Piroplasmídeos 2. Felinos 3. PCR 4. Hematologia 5.Bioquímica

## ABSTRACT

Despite being considered an emergent disease and being reported worldwide, little is known about piroplasm infections in felines. Animals infected with piroplasms may present clinical manifestations or may be asymptomatic. The 18S rRNA gene is used as marker gene for piroplasm detection in felines by means of molecular diagnostic tools. The goal of the present study was to analyze the occurrence of piroplasm infections in domestic felines from Distrito Federal (DF - Brazil) using PCR amplification of the 18S rRNA gene, as well as to identify possible alteration in laboratorial analysis, clinical symptoms and risk factors involved in these infections. We have analyzed 165 domestic cats (*Felis Catus*), 143 from them were admitted to private veterinary clinics in DF and 22 were admitted to Universidade de Brasília's veterinary hospital. The PCR showed that 30.9% of the tested animals were infected by piroplasms. When comparing laboratorial tests results from positive and negative for the piroplasm in PCRs, no statistically significant differences were found ( $p>0.05$ ), with exception of the plasm urea. Most of the positive animals were asymptomatic or presented symptoms not related with the piroplasm infections. This study suggests that felines may be asymptomatic carriers of these microorganisms and/or that the piroplasm species found in the samples may present low pathogenicity in domestic felines.

Key Words: 1.Piroplasmids 2. Felines 3. PCR 4. Hematology 5.Biochemistry

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>		
<b>1</b>	Distribuição geográfica aproximada (por continente) dos piroplasmas felinos descritos na literatura.	<b>14</b>
<b>Capítulo 2</b>		
<b>2</b>	Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o resultado da PCR para piroplasmídeos onde: 1-Marcador de peso molecular, 2- Controle negativo (água), 14 e 15- controle positivo, 12 e 13- animal positivo, 10 e 11- animal positivo, 8 e 9- animal positivo	<b>36</b>

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadros</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>		
<b>1</b>	Resumo dos achados clínicos publicados em casos de piroplasmose felina	<b>7</b>
<b>2</b>	Algumas espécies de piroplasmas já descritas e os métodos diagnósticos utilizados.	<b>11</b>
<b>Tabelas</b>		
<b>Capítulo 2</b>		
<b>1</b>	Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs, gene de origem, temperatura de melting, tamanho dos produtos de amplificação e referência bibliográfica	<b>34</b>
<b>2</b>	Resultado da PCR para infecção por piroplasmídeos por procedência dos animais testados	<b>37</b>
<b>3</b>	Sensibilidade dos meios diagnósticos utilizados na identificação da infecção para piroplasmídeos.	<b>37</b>
<b>4</b>	Queixa de ectoparasitas no momento da consulta por parte dos tutores dos animais testados como positivos	<b>38</b>
<b>5</b>	Hábitos de vida dos animais positivos, segundo tutores	<b>38</b>
<b>6</b>	Animais positivos coinfectados com doenças retrovirais felinas	<b>39</b>
<b>7</b>	Frequência dos achados hematológicos nos hemogramas dos animais positivos	<b>39</b>
<b>8</b>	Sinais clínicos já associados com piroplasmose em outros estudos, e apresentados nos animais positivos para PCR	<b>40</b>
<b>9</b>	Valores médios, desvio padrão e resultado do teste t	<b>41</b>

	de student dos parâmetros do hemograma completo apresentados entre os grupos de animais positivos e negativos para infecção por piroplasmas por meio da PCR	
<b>10</b>	Valores médios, desvio padrão e resultado do teste t de student das análises bioquímicas apresentados entre os grupos de animais positivos e negativos para infecção por piroplasmas por meio da PCR	<b>43</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

°C	Graus Celcius
µl	Microlitros
µM	Micromolar
ALT	Alanino Aminotransferase
CHCM	Concentração de hemoglobina Corpuscular Média
D.	Duração
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleosídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Fosfatase Alcalina
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GGT=	Gama Glutamyltransferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mM	Mili Molar
pb	Pares de Base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
pmol	Picomoles
PPT	Proteínas Plasmáticas Totais
PT	Proteína Total
qPCR	PCR em tempo real
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
UnB	Universidade de Brasília

T.	Temperatura
U	Unidade
VCM	Volume Corpuscular Médio
VG	Volume globular

## CAPÍTULO 1

### 1.INTRODUÇÃO

Piroplasmídeos são protozoários que possuem ciclo de vida complexo envolvendo dois tipos de hospedeiros, os hospedeiros definitivos (carrapatos vetores) e os hospedeiros intermediários (várias espécies de animais vertebrados incluindo os felídeos selvagens e felinos domésticos) (Carli et al, 2012). As maiores famílias desse filo são Babesidae e Theileridae, cujos microorganismos são transmitidos pela picada do artrópode vetor, e parasitam majoritariamente os mamíferos. Alguns parasitas desses gêneros são considerados não patogênicos e outros causam enfermidades severas nos animais domésticos e no homem (Allsopp et al, 1994).

Os primeiros casos de infecção por *Babesia* spp foram descritos em ruminantes na Romênia no final do século XIX (Uilenberg, 1889), porém nos felinos os primeiros relatos ocorreram muito tempo depois, sendo o primeiro em um gato selvagem (*Felis ocreata*) do Sudão (Davis, 1929). A frequência da infecção por piroplasmídeos é muito menor em felinos do que nos caninos, porém essa infecção pode ser fatal nos felinos selvagens e domésticos (Munson et al, 2008), principalmente quando associada a outros patógenos como *Mycoplasma* spp ou viroses como FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) ou FeLV (Vírus da Leucemia Felina) (Criado Fornelio, 2012). Os sinais clínicos da infecção por piroplasmídeos nos felinos são inespecíficos como febre, letargia, anorexia e anemia, o que leva muitas vezes a serem confundidos com infecção por *Mycoplasma* spp (Schoeman et al, 2001, Carli et al, 2012). Aparentemente não há potencial zoonótico no que diz respeito às piroplasmoses felinas,

embora alguns autores apontem a necessidade de mais estudos nessa área, principalmente no que diz respeito à *Babesia (Theileria) annae* (Camacho et al, 2001, Camacho et al, 2002).

Várias espécies de piroplasmídeos já foram descritas nos felinos baseados em critérios morfológicos ou moleculares (Penzhorn, 2006, Solano-Gallego and Baneth, 2011), e sua distribuição geográfica mundial é variada, assim como a espécie de hospedeiro (Criado-Fornelio et al., 2003a e b), sendo a maioria dos relatos casos de *Babesia* spp descritos em regiões da África (Penzhorn, 2004; Schoelman et al 2001) e de casos de *Cytauxzoon* spp nos EUA (Hoover et al, 1994, Brown et al, 2008, Birkenheur et al, 2008). Novas técnicas de diagnóstico molecular tem sido empregadas e merecem mais estudos especialmente por ser um meio diagnóstico mais sensível e específico quando comparado à microscopia em esfregaço sanguíneo, principalmente no caso de portadores assintomáticos (Foreyt, 1989, Criado-Fornelio et al., 2004)

No Brasil, com exceção dos hemoplasmas, os hemoparasitas de gatos domésticos são pouco estudados e relatados, principalmente os piroplasmídeos. Possivelmente isso se deve à menor predisposição da espécie felina à infestação por carrapatos, os artrópodes vetores desses parasitas.

## **1.1 Objetivos Gerais**

Determinar a ocorrência da infecção por piroplasmídeos em felinos domésticos do Distrito Federal

## **1.2 Objetivos Específicos**

**1.2.1.1** Identificar a infecção por piroplasmas em felinos domésticos por meio da PCR

**1.2.1.2** Identificar as possíveis alterações laboratoriais e sinais clínicos, e também fatores de risco envolvidos nessas infecções.

## 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Considerações sobre morfologia, ciclo de vida e taxonomia

Piroplasmídeos são protozoários membros do filo Apicomplexa, cujas maiores famílias são Babesidae e Theileridae, e parasitam células sanguíneas dos animais vertebrados (Levine, 1985, Allsopp et al, 1994). Dentre os piroplasmídeos, várias espécies já foram relatadas em felinos e merecem mais estudos, tais como *Babesia felis*; *Babesia cati*; *Babesia herpailuri*; *Babesia pantherae*; *Babesia leo*; *Babesia canis* e *Cytauxzoon felis* (Baneth et al., 2004; Bourdeau, 1996). Algumas espécies de piroplasmídeos já relatadas na literatura estão apresentadas no Quadro 1 (Criado Fornelio, 2012). *Cytauxzoon felis* é um protozoário pertencente a família Theileridae primeiramente descrito no Missouri-EUA em 1976 (Wagner JE, 1976) parasitando células sanguíneas de linces (*Lynx rufus*) (Glenn et al, 1983), gatos domésticos (Wagner, 1985), e outros felídeos selvagens, e é responsável por considerável taxa de mortalidade e morbidade (Cohn, 2011).

*Babesia* spp, *Theileria* spp, e *Cytauxzoon* spp podem ser classificados como espécies pequenas (< 1.5 µm) ou grandes (> 1.5 µm) baseados no seu aspecto quando o parasita é visualizado dentro dos eritrócitos de seus hospedeiros. A maioria das Babesias felinas, no entanto, não formam cruz de Malta dentro das células sanguíneas (Criado Fornelio, 2012)

O ciclo de vida dos piroplasmídeos envolvem dois tipos de hospedeiros, hospedeiros definitivos e intermediários. Artrópodes da ordem Ixotida (carrapatos) atuam como hospedeiros definitivos no caso da babesiose felina, introduzindo os esporozoítos dos

piroplasmas no sangue do hospedeiro intermediário durante a picada. Esses esporozoítos penetram nos eritrócitos dos hospedeiros onde se reproduzem assexuadamente (Criado Fornelio, 2012). Já o *Cytauxzoon felis* e demais microorganismos da ordem Theileria possuem uma fase pré-eritrocitária, considerada a fase aguda da infecção, que começa com a replicação do esquizógeno nas células mononucleares do hospedeiro, sendo os macrófagos os mais comumente infectados (Susta et al, 2009). Os macrófagos distendidos pelo esquizonte podem levar à obstrução da microvasculatura com a consequente falência dos órgãos. As células mononucleares se rompem liberando os merozoítos que por sua vez são incorporados pelos eritrócitos assim como os demais piroplasmas (Cohn and Birkenheur, 2011). Há relato de transmissão transtadial e transovarial nos hospedeiros definitivos no que diz respeito a *Babesia* spp, porém não foi descrita transmissão transovarial para nenhuma espécie de *Theileria* ou *Cytauxzoon*. Esses tipos de transmissão favorecem várias gerações de vetores a carregarem os hemoparasitas (Solano-Gallego and Baneth, 2011).

Há espécies de *Theileria* relatadas em felinos, como *T. annae* (Criado-Fornelio et al., 2003a), porém ainda não há um consenso sobre esse microorganismo pertencer à família Theileridae (Goethert, 2003). Esta espécie de piroplasma identificada como *Theileria annae* foi descrita em felinos da Europa (Criado- Fornelio 2003, Pennisi et al, 2007), porém anos antes aparentemente o mesmo parasita também foi descrito como uma espécie de *Babesia microti-like* infectando um cão europeu (Zahler et al, 2000). A classificação deste microorganismo como *T. annae* é controversa pois parece não haver uma fase infectante linfocitária como é comum aos microorganismos da ordem Theileria (Goethert and Telford, 2003). Logo, a denominação desse microorganismo como “*Babesia microti-like*” tem sido usada desde então em vários estudos e artigos. Ainda assim o uso dessas denominações têm gerado dúvidas, principalmente após um estudo em que foi sequenciado o gene 18S rRNA de uma *B. microti-like* isolada de pequenos mamíferos no Japão mostrando apenas 95-97% de semelhança com *T. annae* (Saito-Ito et al., 2004; Tsuji et al., 2006), sugerindo então tratar-se de microorganismos diferentes. No entanto, vários autores sugerem que com o propósito de se evitar possíveis confusões no futuro em relação à identificação deste microorganismos, *T. annae* deve ser chamada de *B. annae* (Clancey 2010, Criado Fornelio, 2012).

## 2.2 Patogenia

A apresentação clínica da infecção por piroplasmídeos em felinos é variável, e muito do que se sabe diz respeito apenas aos estudos da infecção por *Babesia felis* e *Cytauxzoon* spp (Criado fornello, 2012). A presença de espécies de babesia típicas de cães é detectada esporadicamente nos gatos domésticos por técnicas moleculares, normalmente sem evidências de sintomatologia clínica (Criado Fornelio et al, 2003b).

Um caso de infecção por *B. cati* em gato (*Felis Catus*) selvagem foi relatado na Índia, onde a única alteração sistêmica encontrada foi pirexia e infestação por alguns carrapatos do gênero *Haemophysalis* sp. (Mudaliar, 1950). Uma forma maior de babesia, *B. canis presentii* foi descrita em um gato de Israel coinfectado com FIV e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e negativo para *Mycoplasma haemofelis*. Esse animal apresentava febre, icterícia, anemia normocítica normocrômica moderada, trombocitopenia e aumento da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT). Os sinais clínicos cessaram 12 dias após início do tratamento com imidocarb, doxiciclina e terapia de suporte, protocolo terapêutico comumente utilizado para infecção por *Babesia* spp (Baneth et al, 2004).

A maior ocorrência da Babesiose felina é por *B. felis*, uma babesia de pequena dimensão no que diz respeito à morfologia, e relatada na África do Sul. As manifestações clínicas incluem principalmente icterícia, anemia, anorexia e letargia (Penzhorn, 2004; Schoelman et al 2001). Diferentemente do que se sabe sobre a infecção por *Cytauxzoon felis*, pirexia não é um achado comum na Babesiose felina (Futter and Belonje, 1980a).

Os parâmetros hematológicos frequentemente alterados nos casos de infecção por *B. felis* são diminuição do hematócrito e número de eritrócitos (Futter and Belonje, 1980b; Schoeman et al., 2001). Trombocitopenia, leucopenia e leucocitose também foram relatadas, porém em menor frequência (Schoeman et al., 2001, Baneth et al, 2004).

Já o *Cytauxzoon felis* é conhecido por causar considerável morbidade e mortalidade entre os gatos domésticos (Kier et al, 1982). Os animais infectados apresentam febre e uma variedade de sinais clínicos podendo variar entre letargia e anorexia, dispnéia severa, falência múltipla de órgãos, pancitopenia e morte (Wagner et al, 1980, Greene et al 1999, Criado Fornelio et al 2004,). Todavia, há relatos de animais infectados com *C. felis* que nunca manifestaram sintomatologia clínica (Meinkoth et al, 2000). Brown (2010) relatou

ocorrência de felinos domésticos assintomáticos persistentemente infectados por *C. felis*, sugerindo que esses felinos tornam-se reservatórios desse parasita.

Alterações histopatológicas foram relatadas em casos de infecção por *C. felis* em gatos domésticos, revelando acometimento de órgãos e tecidos principalmente baço, fígado e pulmão. Essas alterações ocorrem devido à oclusão da microvasculatura desses órgãos por macrófagos parasitados (Susta et al, 2009, Snider et al, 2010).

Várias alterações nos parâmetros bioquímicos também foram relatadas em infecções por piroplasmídeos incluindo aumento sérico de ALT, Gama Glutamina Transferase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA), e Lactato Desidrogenase (LDH). Essas alterações bioquímicas acontecem em decorrência do acometimento do fígado e outros tecidos (Criado Fornelio, 2012). Em um estudo envolvendo 56 gatos infectados com *B. felis*, 80% desses animais tinham menos de 3 anos de idade, 86% apresentavam hiperbilirrubinemia, 89% aumento da atividade da enzima ALT e a grande maioria apresentava anemia macrocítica normocrômica. Nesse estudo 32% dos gatos infectados eram positivos para o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e 14% positivos para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) (Schoeman et al, 2001).

O prognóstico da infecção por piroplasmídeos nos felinos torna-se reservado quando há presença de patógenos concomitantes como *Mycoplasma haemofelis*, *M. haemominutum*, assim como infecção concomitante pelo Vírus da Leucemia Felina e Vírus da Imunodeficiência Felina (Baneth et al., 1998; Schoemann et al., 2001; Criado-Fornelio et al., 2003a; Baneth et al., 2004, Kumar et al., 2008, Carli et al., 2012).

Nos gatos que sobrevivem à infecção inicial, os piroplasmídeos podem persistir dentro dos eritrócitos durante toda a vida do animal (Brown et al, 2008). Esses portadores crônicos são capazes de transmitir a infecção para outros animais através da picada dos carrapatos vetores (Reichard et al, 2010).

Alguns achados clínicos relacionados com a espécie de piroplasma infectante estão relatados no quadro 1.

**Quadro 1:** Resumo de achados clínicos publicados em relatos de piroplasmose felina

<b>Publicação/País</b>	<b>Hospedeiro/Piroplasma</b>	<b>Sinais Clínicos/Achados</b>	<b>Co-infecções</b>
Mudaliar et al., (1950) – Índia	Gato doméstico / <i>Babesia</i> sp	Febre	Nenhuma
Stewart et al., (1980) - África do Sul	Gato doméstico / <i>Babesia</i> sp	Anemia, neutrofilia.	Nenhuma
Hoover et al., (1994) - EUA	Gato doméstico/ <i>Cytauxzoon</i>	Anemia, letargia, anorexia, icterícia, desidratação, Aumento de ALT e bilirubinas	Não investigado
Schoeman et al., (2001) – África do Sul	Gato doméstico/ <i>B. felis</i>	Apatia, anemia, trombocitopenia, Aumento de ALT, ALP, ureia, creatinina e bilirrubina. Icterícia e anorexia foram os menos comuns	>10% co-infectado com <i>Mycoplasma</i> sp, FeLV ou FIV
Baneth et al., (2004) - Israel	Gato doméstico / <i>B. canis presentii</i>	Febre, icterícia, letargia, anemia, hematúria, trombocitopenia, leucopenia, aumento de ALT, LDH e CK	FIV
Birkenheuer et al., (2006b) – EUA	Gato doméstico/ <i>Cytauxzoon felis</i>	Febre, icterícia, pancitopenia.	Não investigado
Weisman et al., (2007) - EUA	Gato doméstico/ <i>C. felis</i>	Aborto	Nenhuma
Harvey et al., (2007) – EUA	Puma/ <i>C. felis</i>	Anemia, aumento de ALT, AST e Bilirrubinas	Nenhuma
Snider et al., (2010)	Gato doméstico/ <i>C. felis</i>	Dispneia, febre, icterícia, anorexia e letargia	Não investigado
Baraboglia (2011) Argentina	Gato doméstico / <i>C. felis</i>	Febre, anorexia, apatia, anemia, hematúria	<i>Mycoplasma</i> sp

Carli et al., (2012) Itália	Gato doméstico/ <i>Cytauxzoon</i> sp	Febre, anemia, diarréia, vômitos, depressão, anorexia, icterícia, sinais neurológicos Aumento de GGT, bilirrubina e uréia.	FIV
--------------------------------	---	--	-----

Adaptado de Criado Fornelio, 2012

## 2.3 Diagnóstico

### 2.3.1 Microscopia

O meio diagnóstico mais utilizado para babesiose felina continua sendo a visualização microscópica destes piroplasmídeos em esfregaços sanguíneos (Foreyt, 1989). Porém, este é um método pouco sensível, particularmente no caso de portadores assintomáticos e em baixas parasitemias (Carli et al., 2012, Simking et al., 2010 ), tornando-se um método muitas vezes falho em detectar os piroplasmídeos (CriadoFornelio et al., 2003a,b). Alguns estudos indicam que a detecção de piroplasmídeos por microscopia em cães é mais fidedigna quando o sangue é obtido de vasos capilares (Bohm et al.,2006), e o mesmo provavelmente se aplica aos felinos (Schoemann et al., 2001).

### 2.3.2 Sorologia

Testes sorológicos para detecção de piroplasmídeos nos felinos foram descritos experimentalmente utilizando a técnica de reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*C.felis* (Shindel, 1978; Cowell et al., 1988; Filoni et al., 2012) e anti-*B.felis* (López-Rebollar et al., 1999). Contudo, esses testes não estão disponíveis comercialmente. Ademais, devido à progressão rápida da doença quando essa leva ao óbito do animal, os anticorpos anti-*Cytauxzoon* podem não ser detectáveis nos estágios iniciais da infecção (Birkenheuer 2006).

### 2.3.3 Diagnóstico molecular

As técnicas de diagnóstico molecular para detecção de hemoparasitas são bem descritas e mais sensíveis em relação à identificação do parasita por meio de microscopia, pois permitem a identificação de organismos geneticamente diferentes, porém morfológicamente indistinguíveis (Birkenheur et al, 2003, Penzhorn, 2006).

Um estudo em Bangkok, Tailândia, comparou a sensibilidade da microscopia em relação ao diagnóstico molecular na detecção de piroplasmas felinos. Nesse estudo, 1490 amostras de gatos de vida livre foram analisadas por microscopia óptica do esfregaço sanguíneo, e somente dois felinos apresentaram resultado positivo na detecção de piroplasmas, sendo esses dois confirmados por meio da PCR. Posteriormente foram feitas PCR do sangue desses 1490 animais sendo 21 positivos. Após sequenciamento genético, todos os resultados positivos tratavam-se de *Babesia vaginali*. (Simking et al, 2010)

O gene 18S rRNA tem sido o gene de eleição para detecção de piroplasmídeos (e também de outros microorganismos) em felinos, por meio de técnicas de diagnóstico molecular. Allsopp et al (1994) foram os primeiros autores a sequenciar o gene 18S rRNA de um piroplasmídeo em felino, no caso *C. felis*. Meinkot et al (2000) utilizaram técnicas moleculares envolvendo o mesmo gene para estudar felinos persistentemente infectados com *C. felis* nos EUA. Os oligonucleotídeos desenvolvidos por Meinkoth et al (2000) foram utilizados com sucesso em outros estudos para diagnosticar infecção por *Cytauxzoon* sp, porém por se tratar de oligonucleotídeos que amplificam vários piroplasmas, a identificação do parasita torna-se necessária por meio do sequenciamento genético do DNA para confirmação da espécie do microorganismo (Reichard et al., 2005, Millán et al., 2007 e 2009).

Penzhorn et al (2001) realizaram estudo na África do Sul onde foi realizada PCR e sequenciamento genético para identificação de animais infectados com *B. leo* e *B. felis*, quando em estudo anterior um novo parasita, no caso *B. Leo*, tinha sido relatado através da técnica de microscopia (Lopez-Rebollar et al., 1999).

Um estudo molecular conduzido por Criado Fornelio et al (2003) relatou a infecção por *Babesia canis canis* e *Babesia (Theileria) annae* em gatos domésticos de Portugal. Esse estudo encontrou 4 gatos positivos de um total de 16 gatos testados. O sequenciamento genético foi feito indicando 3 gatos infectados com *B. canis canis* sendo um

desses três também infectado com *Theileria annae*, e um gato infectado apenas com *Theileria annae*. Desses 4 gatos positivos, apenas um manifestava sintomatologia clínica compatível com infecção por piroplasmas (Criado Fornelio et al, 2003b). Uma subespécie de babesia relaciona a *B. canis canis*, *B. canis presentii*, foi relatada por Baneth et al (2004) em gatos domésticos de Israel.

Diversos ensaios de PCR têm sido usados para estudo de infecção por piroplasmídeos em felinos. Um ensaio de PCR publicado por Birkenheuer et al., (2006a) foi desenvolvido para detecção apenas de *C. felis*, e devido ao elevado grau de especificidade esse ensaio não detecta outros piroplasmídeos além de *C. felis*. Os oligonucleotídeos PIRO F/ PIRO R, primeiramente desenvolvidos por Ano et al., (2001) para detecção de piroplasmídeos em cães, foram usados com sucesso para o mesmo fim em gatos domésticos (Simking et al., 2010).

Algumas espécies de piroplasmas já descritas e o método diagnóstico do estudo estão resumidas no Quadro 2:

**Quadro 2:** Algumas espécies de piroplasmas já descritas e os métodos diagnósticos utilizados.

<b>Espécie</b>	<b>Tamanho / Cruz de Malta</b>	<b>Método diagnóstico</b>	<b>Publicação- país</b>
<i>Babesia cati</i>	Grande/Não	Gato selvagem ( <i>Felis Catus</i> ) / Microscopia	Mudaliar et al., (1950) India
<i>B. herpailuri</i>	Grande/Não	<i>Herpailurus jaguarundi</i> / Microscopia	Dennig, (1967) – Venezuela
<i>B. pantherae</i>	Grande/Não	<i>Panthera pardus</i> / Microscopia	Dennig et al., (1972) - Kênia
<i>B. canis vogeli</i>	Não observado por microscopia	Gato doméstico / RLB + sequenciamento	Georges et al., (2008) - Trinidade
<i>B. canis vogeli</i>	Grande/Não	Gato doméstico /Microscopia + sequenciamento	Simking et al., (2010) - Tailândia
<i>B. felis = Babesiella felis?</i> (Carpano, 1934)	Pequena/Sim	<i>Felis sylvestris</i> / Microscopia (Davis, 1929) e sequenciamento (Penzhorn et al., 2001).	Davis, (1929) – Sudan and Penzhorn et al., (2001) – África do Sul
<i>B. leo</i>	Pequena/Sim	<i>Panthera leo</i> / Microscopia + sequenciamento	Penzhorn et al., (2001) – África do Sul
<i>Cytauxzoon felis</i>	Pequena/Não	Gato Doméstico / Microscopia	Wagner, (1976) - EUA
<i>Cytauxzoon sp</i>	Pequena/Não	Gato doméstico / sequenciamento (Criado-Fornelio et al., (2004) Microscopia + sequenciamento(Millán et al., (2007)	Criado-Fornelio et al., (2004) and Millán et al., (2007) - Espanha
<i>C. manul</i>	Pequena/Não	<i>Otocolobus manul</i> / Microscopia+ sequenciamento	Reichard et al., (2005) - Mongolia
<i>Babesia sp</i>	Pequena/Não	<i>Puma concolor</i> / Microscopia + sequenciamento	Yabsley et al., (2006) - EUA
<i>B. canis presentii</i>	Pequena/Não	Gato doméstico / Microscopia + sequenciamento	Baneth et al., (2004) – Israel

<i>B. canis canis</i>	Não observado por microscopia	Domestic cat / Sequenciamento	Criado Fornelio et al., (2003a) - Espanha
<i>Babesia (Theileria) annae (B. microti-like)</i>	Não observado por microscopia	Gato doméstico / Sequenciamento	Criado-Fornelio et al., (2003a) - Portugal
<i>B. lengau</i>	Pequena/Não	<i>Acinonyx jubatus</i> / Microscopia + sequenciamento	Bosman et al., (2010) – África do Sul

Adaptado de Criado Fornelio, 2012

## 2.4 Epizootiologia

A frequência da babesiose felina é considerada irregular. Casos de infecção de felinos domésticos por *Babesia* spp foram descritos em vários países do mundo incluindo França (Leger et al, 1992), Alemanha (Moik & Goethe, 1997), Tailândia (Jittapalapong e Jansawan, 1993) e Zimbabwe (Stewart, 1980), porém nesses relatos o hemoparasita foi identificado por meio de microscopia em esfregaço sanguíneo e não foi possível identificar os subtipos de babesias.

A babesiose felina ocasionada por *B. felis* tem sido mais relatada e estudada em países africanos, onde parece haver uma frequência maior desse microorganismo (Penzhorn, 2004; Schoelman et al 2001). Nos felídeos silvestres foram descritos vários outros tipos de babesia incluindo *Babesia hepailure* (Denning, 1967), *Babesia phanerae* (Denning, 1972), *Babesia leo* (Penzhorn, 2001) e um piroplasmídeo não identificado em um guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Averbeck, 1990).

Nos felinos europeus, a frequência da infecção por piroplasmas varia de 0 a 20% segundo trabalhos publicados (Millán et al., 2009; Criado-Fornelio et al., 2003a, 2004, 2009b; Pennisi et al., 2007 and Carli et al., 2012). Essa grande variabilidade pode ser devida às variações de espécies dos microorganismos, fatores climáticos e/ou geográficos ou surtos epidemiológicos. Frequências altas foram encontradas em estudos tanto de áreas não tropicais, como de áreas tropicais (Millán et al., 2007 and 2009, Criado fornelio, 2012). A frequência de infecção por *B. canis vogelis* em gatos domésticos na Tailândia mostrou-se similar à frequência registrada na Europa (Simking et al, 2010). Outros estudos em felídeos silvestres

de áreas tropicais encontraram prevalência variando de 3,7 a 100% (André et al., 2011; Widmer, 2009).

O *Cytauxzoon felis* foi primeiramente descrito no Missouri-EUA em 1976 (Wagner JE, 1976) e vários artigos já descreveram a infecção desse parasita em felinos norte americanos, onde parece haver influência climática para a infecção (final da primavera e início do outono), assim como a susceptibilidade desses felinos às picadas dos carrapatos vetores (Reichard et al., 2008, 2009).

Recentemente foi relatado no município de Areal, Rio de Janeiro, o primeiro caso no Brasil de infecção por *C. felis* em felino doméstico confirmado por técnicas moleculares (Maia et al, 2013). Outros estudos confirmaram por técnicas moleculares a ocorrência natural de *C. felis* em felídeos selvagens brasileiros (Peixoto et al., 2007; André et al., 2009; Filoni et al., 2012). Anteriormente os poucos trabalhos publicados sobre a ocorrência de *C. felis* no Brasil baseavam-se na confirmação do hemoparasita por meio da visualização em esfregaços sanguíneos (Mendes de Almeida et al., 2007).

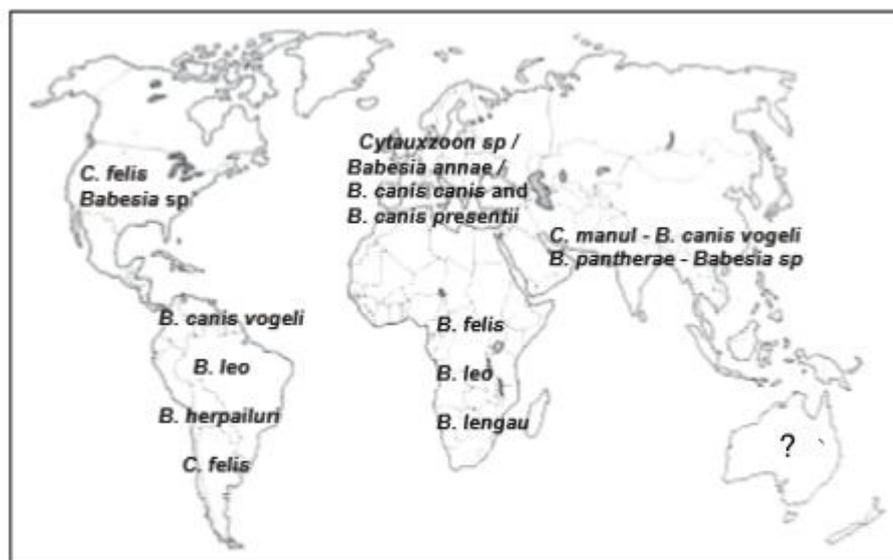
No que se refere aos hospedeiros vertebrados dos piroplasmas felinos, sugere-se que alguns desses hematozoários são capazes de infectar uma grande variedade de espécies de hospedeiros, e outros uma menor variedade. *Cytauxzoon* spp, por exemplo, pode parasitar espécies de felídeos silvestres e domésticos, enquanto outros piroplasmídeos podem parasitar, além dos felídeos, várias outras espécies de mamíferos. Exemplos de espécies que parasitam outros tipos de mamíferos além de felídeos são *B. leo* e espécies relacionadas, assim como *Babesia (Theileria) annae* e a maioria das espécies relacionadas à *B. canis* com exceção talvez de *B. canis rossi* (Criado Fornelio, 2012).

A habilidade de sobreviver em diferentes hospedeiros é favorecida por fatores biológicos tanto do microorganismo patógeno como do artrópode vetor. Os artrópodes com capacidade de parasitar várias espécies de mamíferos podem facilitar a disseminação dos hematozoários (Harbison e Clayton, 2011), embora vários outros fatores estejam envolvidos nessa disseminação.

A informação disponível sobre os vetores dos piroplasmas felinos é escassa. Acredita-se que *C. felis* seja transmitido por espécies de *Dermacentor* sp (Blouin et al., 1984), embora estudos recentes sugiram que o carrapato *Amblyomma americanum* possa atuar também como hospedeiro definitivo desse microorganismo nos EUA (Reichard et al., 2009

and 2010). Sabe-se que *B. canis canis* e *B. canis presentii* também podem ser transmitidas pelas espécies de *Dermacentor* (Criado-Fornelio et al., 2003a; Baneth et al., 2004), enquanto *B. canis vogeli* pode ser transmitida pelo *Rhipicepalus sanguineus* (Simking et al., 2010). Na Europa, o carrapato *Dermacentor marginatus* é conhecido por ser o artrópode vetor do *Cytauxzoon* spp. Esse ectoparasita é encontrado em uma grande variedade de mamíferos (Hopla et al., 1994) porém o *Cytauxzoon* spp foi encontrado em gatos e lincos europeus, mas nunca em cães ou raposas (Criado-Fornelio et al., 2003a, 2004, 2006, 2007 and 2009b; Millan et al., 2007; Giménez et al., 2009; Dezdek et al., 2010; Carli et al., 2012). Isso sugere que o *Cytauxzoon* spp na Europa possui restrita especificidade para o hospedeiro vertebrado, no caso os felídeos, não sendo capaz de sobreviver em canídeos e isso também pode ser verdade para *C. felis* nos EUA. *Babesia (Theileria) annae* na Europa pode ser transmitida por diversas espécies de carrapatos, inclusive *R. sanguineus* (Camacho et al., 2003; Sun et al., 2008; Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010). Já os vetores da babesiose felina na África do Sul e América do Sul não são conhecidos (Penzhorn et al., 2004; Dantas-Torres et al., 2008; Widmer, 2009; André et al., 2011).

Criado Fornelio (2012) fez uma compilação da distribuição geográfica das espécies de piroplasmas felinos relatados em estudos publicados. A compilação englobou felinos domésticos e selvagens, enfatizando os relatos em que o diagnóstico baseou-se nos meios moleculares (Figura1).



**Figura 1:** Distribuição geográfica aproximada por continente dos piroplasmas felinos descritos na literatura. Adaptada de Criado Fornelio, 2012.

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, M.R, ADANIA, C.H, MACHADO, R.Z, ALLEGRETTI, S.M, FELIPPE, PAN, SILVA, K.F, NAKAGHI, A.C.H, DAGNONE, A. S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases** v.45, n.1; p.234-237. 2009

ALLSOPP, M., CAVALIER-SMITH, T., WAAL, D., & ALLSOPP, B. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology** v.108, n.2; p.147-152. 1994

ANO, H., MAKIMURA, S., HARASAWA, R., Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.111-113. 2001

Averbeck, G. A., Bjork, K. E., Packer, C., & Herbst, L. Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 3, p. 392-394, 1990.

BARABOGLIA, E.R., Hallazgo de un hemoparásito eritrocítico tipo *Cytauxzoon felis* en *Felis catus domesticus*, **Revista Eletrônica de Veterinária** v.12; p.1-29. 2011

BANETH, G.,KENNY,M.J.,vTASKER,S., ANUG,Y., SHKAP,V., LEVY, A., SHAW,S.E.,  
Infection With a proposed new subspecies of Babesia canis, Babesia Canis subsp. presentii, in  
domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**. V.42; p99–105. 2004

BENDELE, R.A, SCHWARTZ,W,L, JONES, L.P: Cytauxzoonosis like disease in Texas cats.  
**The Southwestern veterinarian** v.29; p.244–246. 1976

BIRKENHEUER, A.J., MARR, H., ALLEMAN, A.R., LEVY, M.G., BREITSCHWERDT,  
E.B., Development and evaluation of a PCR assay for the detection of Cytauxzoon felis DNA  
in feline blood samples. **Veterinary Parasitology**, v.137; p.144-9. 2006a

Birkenheuer, A. J., Le, J. A., Valenzisi, A. M., Tucker, M. D., Levy, M. G., &  
Breitschwerdt, E. B. Cytauxzoon felis infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases  
(1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 4, p.  
568-571, 2006.

BLOUIN, E.F., KOCAN, A.A., GLENN, B.L., KOCAN, K.M., HAIR, J.A., Transmission of  
Cytauxzoon felis Kier, 1979 from bobcats, Felis rufus (Schreber), to domestic cats by  
Dermacentor variabilis (Say). **The Journal of Wildlife Diseases**, v.20; p.241-2. 1984

BROWN, H. M.; LATIMER, K. S.; ERIKSON, L. E.; CASHWELL, M. E.; BRITT, J. O.;  
PETERSON, D. S.; Detection of persistent Cytauxzoon felis infection by polymerase chain  
reaction in asymptomatic domestic cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**  
v.20; p.485-488. 2008.

BROWN, H. M., LOCKHART, J. M., LATIMER, K. S., & PETERSON, D. S. Identification  
and genetic characterization of Cytauxzoon felis in asymptomatic domestic cats and bobcats.  
**Veterinary parasitology**, v.172 n.3; p.311-316. 2010

- BÖHM, M., LEISEWITZ, A.L., THOMPSON, P.N., SCHOEMAN, J.P., (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. **Veterinary Parasitology**, v,141, p.18- 29.
- CAMACHO, A.T., PALLAS, E., GESTAL, J.J., GUITIÁN, F.J., OLMEDA, A.S., GOETHERT, H.K., TELFORD, S.R.,. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **The Veterinary Record**, 149, 552-555. 2001
- CAMACHO, A.T., PALLAS, E., GESTAL, J., GUITIÁN, J., OLMEDA, A., KENNY, M., TELFORD, S., SPIELMAN, A., *Babesia microti*: ¿una nueva forma de babesiosis humana en Europa? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.20, p.417-418. 2002
- CASSINI, R., ZANUTTO, S., FRANGIPANE-DI-REGALBONO, A., GABRIELLI, S., CALDERIN, P., MORETTI, A., TAMPIERI, M.P., PIETROBELLI, M., Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.30-35. 2009
- CARLI, E., TROTTA, M., CHINELLI, R., DRIGO, M., SINIGOI, L., TOSOLINI, P., FURLANELLO, T., MILLOTTI, A., CALDIN, M., SOLANO-GALLEGO L. Cytauxzoon sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.343-352. 2012
- CLANCEY N, HORNEY B, BURTON S, BIRKENHEUER A, MCBURNEY S, TEFFT K. *Babesia* (*Theileria*) *anna*e in a red fox (*Vulpes vulpes*) from Prince Edward Island, Canada. **Journal of wildlife diseases**, v. 46, n. 2, p. 615-621, 2010.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARANA, A., BARBA-CARRETERO, J.C., Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and

piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary microbiology**, v. 93, n. 4, p. 307-317, 2003a.

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBACARRETERO, J.C., Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary parasitology**, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003b.

CRIADO-FORNELIO, A., GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M.A., BULING-SARAÑA, A., BARBACARRETERO, J.C., The “expanding universe” of piroplasms. **Veterinary parasitology**, v. 119, n. 4, p. 337-345, 2004.

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

COHN LA, BIRKENHEUER AJ. Cytauxzoonosis. In: Greene C (ed). Infectious diseases of the dog and cat. St Louis, MO: **Saunders Elsevier**, p.764–770. 2011

COWELL, R.L., FOX, J.C., PANCIERA, R.J., TYLER, R.D., Detection of anticytauxzoon antibodies in cats infected with a Cytauxzoon organism from bobcats. **Veterinary parasitology**, v. 28, n. 1-2, p. 43-52, 1988.

DANTAS-TORRES F., Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DAVIS, L.J., On a piroplasm of Sudanese wild cat (*Felis ocreata*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.22, p.523-534. 1929

DENNING, H. K. Eine unbekannte Babesienart beim Jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*). **Kleintierpraxis**, v. 12, p. 146-152, 1967.

DENNING, H. K., AND D. W. BROCKELSBY. *Babesia pantherae* sp. nov., a piroplasm of the leopard (*Panthera pardus*). **Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 525-532, 1972.

DEZDEK, D., VOJTA, L., CURKOVIĆ, S., LIPEJ, Z., MIHALJEVIĆ, Z., CVETNIĆ, Z., BECK, R., (2010). Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. **Veterinary Parasitology**. 172, 333-336.

FILONI, C., CATÃO-DIAS, J. L., CATTORI, V., WILLI, B., MELI, M. L., CORRÊA, S. H. R., ... & NETO, J. S. F. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 24, n. 1, p. 166-173, 2012.

FOREYT, W.J., Diagnostic parasitology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 19, n. 5, p. 979-1000, 1989.

FUTTER, G.J., BELONJE, P.C., VAN DEN BERG, A., Studies of feline babesiosis 3. Haematological findings. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 51, n. 4, p. 271-280, 1980.

GIMÉNEZ, C., CASADO, N., CRIADO-FORNELIO, A., DE MIGUEL, F.A., DOMÍNGUEZPEÑAFIEL, G., New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93-99, 2006.

GLENN, B. L.; KOCAN, A. A.; BLOUIN, E. F. Cytauxzoonosis in bobcats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 11, p. 1155-1158, 1983.

GOETHERT, H. K.; TELFORD, S. R. What is Babesia microti?. **Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 301-309, 2003.

HAUCK, W. N.; SNIDER 3RD, T. G.; LAWRENCE, J. E. Cytauxzoonosis in a native Louisiana cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 12, p. 1472, 1982.

HARBISON, C.W., CLAYTON, D.H. Community interactions govern host-switching with implications for host-parasite coevolutionary history. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 108,

HARVEY, J.W., DUNBAR, M.R., NORTON, T.M., YABSLEY, M.J., (2007). Laboratory findings in acute Cytauxzoon felis infection in cougars (*Puma concolor* cougar) in Florida. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 38, 285-91.

HOOVER JP, WALKER DB, HEDGES JD: 1994, Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985–1992). **J Am Vet Med Assoc** 203:455–460

HOPLA, C.A, DURDEN, L.A., KEIRANS, J.E., (1994). Ectoparasites and classification. **Office Internationale des épizooties**, 13, 985-1017

IORI, A., GABRIELLI, S., CALDERINI, P., MORETTI, A., PIETROBELLI, M., TAMPIERI, M.P., GALUPPI, R., CANCRINI, G., (2010). Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. **Veterinary Parasitology**, 170, 291-296

JITTAPALAPONG, S. & W. JANSAWAN. 1993. Preliminary survey on blood parasites of cats in Bangkok District Area. *Kasetsat. J. Nat. Sci.* 27: 330–335.

KIER, A. B., J. E. WAGNER, AND L. C. MOREHOUSE. 1982a. Experimental transmission of *Cytauxzoon felis* from bobcats (*Lynx rufus*) to domestic cats (*Felis domesticus*). **American Journal of Veterinary Research** 43: 97-101.

LEGER, N., H. FERTE, P. BERTHELOT, ET AL. 1992. A case of feline babesiosis in HauteSaone, France. **Sci. Vet. Med. Comp.** 94: 249–252.

LEVINE, N. D. (1985). *Veterinary Protozoology*. Ames: Iowa State University Press.

LOPEZ-REBOLLAR LM, PENZHORN BL, DE WAAL DT, LEWIS BD., (1999). A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, 35, 82-85.

MAIA, L. M. P.; CERQUEIRA, A. M. F.; MACIEIRA, D. B.; SOUZA, A. M.; MOREIRA, N. S.; SILVA, A. V.; MESSICK, J. B.; FERREIRA, R. F. F.; ALMOSNYL, N. R. P. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v.22, n.2, 2013.

MILLÁN, J., NARANJO, V., RODRÍGUEZ, A., DE LA LASTRA, J.M., MANGOLD, A.J., DE LA FUENTE, J., (2007). Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. **Parasitology**, 134, 995-1001

MILLÁN, J., CANDELA, M.G., PALOMARES, F., CUBERO, M.J., RODRÍGUEZ, A., BARRAL, M, DE LA FUENTE, J., ALMERÍA, S., LEÓN-VIZCAÍNO, L., (2009). Disease

threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **The Veterinary Journal**, 182, 114-124.

MENDES-DE-ALMEIDA, F., LABARTHE, N., GUERRERO, J., FARIA, M. C. F., BRANCO, A. S., PEREIRA, C. D., ... & PEREIRA, M. J. S. (2007). Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary parasitology**, 147(1), 9-15.

MEINKOTH, J., KOCAN, A. A., WHITWORTH, L., MURPHY, G., FOX, J. C. AND WOODS, J. P. (2000), Cats Surviving Natural Infection with *Cytauxzoon felis*: 18 Cases (1997–1998). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 14: 521–525.

MUNSON, L., TERIO, K.A., KOCK, R., MLENGEYA, T., ROELKE, M.E., DUBOVI, E., SUMMERS, B., SINCLAIR, A.R., PACKER, C., (2008). Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. **PLoS One**, 3(6):e2545

MUDALIAR, S.V., G.R. ACHARY, AND V.S. ALWAR. 1950. On a species of *Babesia* in an Indian wild cat (*Felis catus*). **Indian Vet. J.** 26:391–395

MOIK, K., & GOTHE, R. (1997). *Babesia* infections of felids and a report on a case in a cat in Germany. **tierärztliche praxis ausgabe kleintiere heimtiere**, 25(5), 532-535.

PEIXOTO PV, SOARES CO, SCOFIELD A, SANTIAGO CD, FRANCA TN, BARROS SS. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Vet Parasitol** 2007; 145(3-4): 383-387. PMID:17306459.

PENNISI, M.G., ALONGI, A., AGNONE, A., VITALE, F., REALE, S., TORINA, A. (2007). Cats as reservoir of *Babesia microti*-like. **Parassitologia**, 49S1, 100

PENZHORN, B. L., A. M. KJEMTRUP, L. M. LOPEZ-REBOLLAR, AND P. A. CONRAD. 2001. Babesia leonsp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. **J. Parasitol.** 87:681–685

PENZHORN, B. L., SCHOEMAN, T. AND JACOBSON, L. S. (2004), Feline Babesiosis in South Africa: A Review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1026: 183–186.

REICHARD, M.V., BAUM, K.A., CADENHEAD, S.C., SNIDER, T.A., (2008). Temporal occurrence and environmental risk factors associated with cytauxzoonosis in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, 152, 314-320.

REICHARD, M.V., MEINKOTH, J.H., EDWARDS, A.C., SNIDER, T.A., KOCAN, K.M., BLOUIN, E.F., LITTLE, S.E., (2009). Transmission of Cytauxzoon felis to a domestic cat by Amblyomma americanum. **Veterinary Parasitology**, 161, 110-115.

SCHOEMAN, T., LOBETTI, R.G., JACOBSON, L.S., PENZHORN, B.L., (2001). Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. **Journal of the South African Veterinary Association**, 72, 4-11.

SIMKING, P., WONGNAKPHEK, S., STICH, R.W., JITTAPALAPONG, S., (2010). Detection of Babesia vogeli in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand. **Veterinary Parasitology**, 173, 70-75.

SHINDEL, N., DARDIRI, A.H., FERRIS, D.H., (1978). An indirect fluorescent antibody test for the detection of Cytauxzoon-like organisms in experimentally infected cats. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, 42, 460-465

SNIDER, T.A., CONFER, A.W., PAYTON, M.E., (2010). Pulmonary histopathology of Cytauxzoon felis infections in the cat. **Veterinary Pathology**, 47, 698702.

SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats - expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, 181, 48-60.

SUN, Y., LIU, G., YANG, L., XU, R., CAO, W., (2008). Babesia microti-like rodent parasites isolated from Ixodes persulcatus (Acari: Ixodidae) in Heilongjiang Province, China. **Veterinary Parasitology**, 156, 333-339.

SUSTA, L., TORRES-VELEZ, F., ZHANG, J., BROWN, C., (2009). An in situ hybridization and immunohistochemical study of cytauxzoonosis in domestic cats. **Veterinary Pathology**, 46, 1197-1204.

STEWART, C. G., HACKETT, K. J. W., AND M. G. COLLETT. 1980. An unidentified Babesia of the domestic cat (Felis domesticus). **J. S. Afr. Vet. Assoc.** 51:219– 221

WAGNER, J. E. 1975. Cytauxzoonosis in domestic cats (Felis domesticus) in Missouri. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 167:874

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

WAGNER, J. E., FERRIS, D. H., KIER, A. B., WIGHTMAN, S. R., MARING, E., MOREHOUSE, L. G., & HANSEN, R. D. (1980). Experimentally induced cytauxzoonosis-like disease in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, 6(4), 305-311.

WEISMAN, J.L., Woldemeskel, M., Smith, K.D., Merrill, A., Miller, D., (2007). Blood smear from a pregnant cat that died shortly after partial abortion. **Veterinary Clinics Pathology**, 36, 209-211.

WIDMER, C.E., (2009). Perfil sanitario des onças-pintadas (*Panthera onca*) da vida livre no Pantanal de Sul de Matto Grosso do Sul - Brasil. PhD Dissertation, College of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, (Sao Paulo, Brazil), pp. 1-78.

TSUJI, M., ZAMOTO, A., KAWABUCHI, T., KATAOKA, T., NAKAJIMA, R., ASAKAWA, M., ISHIHARA, C., (2006). Babesia microti-like parasites detected in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris orientis*) in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, 68, 643-646

UILENBERG, G., FRANSSSEN, F.F., PERIE, N.M., SPANJER, A.A., 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet.* 11, 33-40

ZÄHLER, M., RINDER, H., SCHEIN, E., GOTHE, R., (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, 89, 241-248.

## CAPÍTULO 2

### PIROPLASMÍDEOS EM GATOS DOMÉSTICOS RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL

#### 1. RESUMO

A infecção por piroplasmídeos nos felinos são consideradas doenças emergentes, relatadas no mundo todo, porém relativamente pouco estudadas. Os animais infectados com piroplasmas podem manifestar doença clínica decorrente da infecção, ou serem assintomáticos. O gene 18S rRNA tem sido o gene de eleição para detecção de piroplasmídeos em felinos, por meio de técnicas de diagnóstico molecular. O presente trabalho teve por objetivos determinar a ocorrência da infecção por piroplasmídeos nos felinos domésticos do Distrito Federal por meio da PCR, assim como identificar as possíveis alterações laboratoriais, sintomatologia clínica e também fatores de risco envolvidos nessas infecções. Foram avaliados 165 gatos domésticos (*Felis Catus*), sendo 143 provenientes de clínicas veterinárias particulares do DF e 22 provenientes de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Por meio da PCR, 31,09% dos animais testados estavam infectados por piroplasmídeos. Em relação aos achados laboratoriais não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre o grupo de animais positivos e negativos na PCR, com exceção da mensuração da uréia plasmática. A maioria dos animais positivos foi assintomática ou possuía sintomatologia não relacionada a infecção por piroplasmídeos. Esse estudo sugere que os felinos podem ser potenciais portadores desses

microorganismos e/ou que as espécies de piroplasmas encontradas na amostragem podem ser espécies de baixa patogenicidade para os gatos domésticos.

Palavras chave: 1.Piroplasmídeos 2. Felinos 3. PCR 4. Hematologia 5.Bioquímica

## 2.ABSTRACT

Despite being considered an emergent disease and being reported worldwide, little is known about piroplasm infections in felines. Animals infected with piroplasms may present clinical manifestations or may be asymptomatic. The 18S rRNA gene is used as marker gene for piroplasm detection in felines by means of molecular diagnostic tools. The goal of the present study was to analyze the occurrence of piroplasm infections in domestic felines from Distrito Federal (DF - Brazil) using PCR amplification of the 18S rRNA gene, as well as to identify possible alteration in laboratorial analysis, clinical symptoms and risk factors involved in these infections. We have analyzed 164 domestic cats (*Felis Catus*), 142 from them were admitted to private veterinary clinics in DF and 22 were admitted to Universidade de Brasília's veterinary hospital. The PCR showed that 31,09% of the tested animals were infected by piroplasms. When comparing laboratorial tests results from positive and negative for the piroplasm in PCRs, no statistically significant differences were found ( $p>0.05$ ), with exception of the plasm urea. Most of the positive animals were asymptomatic or presented symptoms not related with the piroplasm infections. This study suggests that felines may be asymptomatic carriers of these microorganisms and/or that the piroplasm species found in the samples may present low pathogenicity in domestic cats.

Key Words: 1.Piroplasmids 2. Felines 3. PCR 4. Hematology 5.Biochemistry

### 3.INTRODUÇÃO

Piroplasmídeos são protozoários que possuem ciclo de vida complexo envolvendo dois tipos de hospedeiros, os hospedeiros definitivos (carrapatos vetores) e os hospedeiros intermediários (várias espécies de animais vertebrados incluindo os felídeos selvagens e felinos domésticos) (Carli et al, 2012). As maiores famílias desse filo são Babesidae e Theileridae, cujos microorganismos são transmitidos pela picada do artrópode vetor, e parasitam majoritariamente os mamíferos. Alguns parasitas desses gêneros são considerados não patogênicos e outros causam enfermidades severas nos animais domésticos e no homem (Allsopp et al, 1994).

Os primeiros casos de infecção por *Babesia* spp foram descritos em ruminantes na Romênia no final do século XIX (Uilenberg, 1889), porém nos felinos os primeiros relatos ocorreram muito tempo depois, sendo o primeiro em um gato selvagem (*Felis ocreata*) do Sudão (Davis, 1929). A frequência da infecção por piroplasmídeos é muito menor em felinos do que nos caninos, porém essa infecção pode ser fatal nos felinos selvagens e domésticos (Munson et al, 2008), principalmente quando associada a outros patógenos como *Mycoplasma* spp ou viroses como FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) ou FeLV (Vírus da Leucemia Felina) (Criado Fornelio, 2012). Os sinais clínicos da infecção por piroplasmídeos nos felinos são inespecíficos como febre, letargia, anorexia e anemia, o que leva muitas vezes a serem confundidos com infecção por *Mycoplasma* spp (Schoeman et al, 2001, Carli et al, 2012). Aparentemente não há potencial zoonótico no que diz respeito às piroplasmoses felinas, embora alguns autores apontem a necessidade de mais estudos nessa área, principalmente no que diz respeito à *Babesia (Theileria) annae* (Camacho et al, 2001, Camacho et al, 2002).

Várias espécies de piroplasmídeos já foram descritas nos felinos baseados em critérios morfológicos ou moleculares (Penzhorn, 2006, Solano-Gallego and Baneth, 2011), e

sua distribuição geográfica mundial é variada, assim como a espécie de hospedeiro (Criado-Fornelio et al., 2003a e b), sendo a maioria dos relatos casos de *Babesia* spp descritos em regiões da África (Penzhorn, 2004; Schoelman et al 2001) e de casos de *Cytauxzoon* spp nos EUA (Hoover et al, 1994, Brown et al, 2008, Birkenheur et al, 2008). Novas técnicas de diagnóstico molecular tem sido empregadas e merecem mais estudos especialmente por ser um meio diagnóstico mais sensível e específico quando comparado à microscopia em esfregaço sanguíneo, principalmente no caso de portadores assintomáticos (Foreyt, 1989, Criado-Fornelio et al., 2004)

No Brasil, com exceção dos hemoplasmas, os hemoparasitas de gatos domésticos são pouco estudados e relatados, principalmente os piroplasmídeos. Possivelmente isso se deve à menor predisposição da espécie felina à infestação por carrapatos, os artrópodes vetores desses parasitas.

## 4.MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos experimentais desse projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal –CEUA- UnB (Protocolo 40/2017).

### 4.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue de 164 gatos domésticos (*Felis catus*) residentes no Distrito Federal, sendo 142 provenientes de clínicas veterinárias particulares do DF (Mundo dos Gatos Clínica Veterinária e consultório Giovanna Mazzoti Medicina Felina) e 22 provenientes de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

Os tutores dos animais preencheram um questionário para fins de conhecimento sobre os hábitos de vida do animal (Anexo 1). Os animais foram escolhidos aleatoriamente, independente de raça, sexo, idade ou condição clínica, e classificados em dois grupos de acordo com o resultado diagnóstico do teste molecular (animais positivos e negativos para o protocolo BTBABE). As amostras de sangue venoso foram colhidas por punção da veia cefálica ou femoral e foram acondicionadas em tubos com EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) e sem anticoagulante.

#### **4.1.1 Realização de hemograma e perfis bioquímicos.**

Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do HVet-UnB, no Laboratório Citopet –Brasília DF e no Laboratório Lavet – Brasília DF, de acordo com a procedência do animal e da amostra.

As amostras foram submetidas à contagem celular em contador automático de células para uso veterinário (ABC Vet Horiba® ABX diagnostics, Brazil) onde foi determinada a concentração de hemoglobina, número de hemácias, leucócitos e plaquetas. Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O Volume Globular (VG) foi determinado pela técnica de micro-hematócrito com utilização de capilares sem heparina e micro-centrífuga. As proteínas plasmáticas (PPT) foram determinadas com auxílio de refratômetro portátil (modelos SZJ-D e RTP-20 ATC). Foram preparados esfregaços de sangue total com corante comercial tipo Romanowsky (Panótico rápido Instant Prov New Prov®, Pinhais, Paraná, Brazil) para realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas.

Para avaliação das análises bioquímicas foi separado soro das amostras acondicionadas em tubos sem EDTA. Foram utilizados kits bioquímicos específicos (Labtests®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semi automático (Bioplus® Bio2000, Barueri, São Paulo, Brazil) para avaliação dos valores séricos de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina, gama glutamiltransferase (GGT), e bilirrubinas.

#### **4.1.2 Extração do DNA**

Até o momento da extração do DNA total, as amostras de sangue total acondicionadas nos tubos com EDTA foram armazenadas a 4°C. A partir de 200µL de sangue foi realizada a extração utilizando kit comercial (Promega Corporation®, WI, EUA)

seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

#### 4.2 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

Todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima GAPDH (gliceraldeído-3fosfato desidrogenase), para verificar a qualidade da extração e a integridade do DNA obtido assim como a presença de inibidores da PCR. Em seguida as amostras foram submetidas à PCR para o diagnóstico dos piroplasmídeos.

A mistura para a PCR da GAPDH foi composta de tampão 1X de PCR, 10ng de DNA, MgCL<sub>2</sub> 1,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Vila Guarani, São Paulo, Brazil), 1µL de cada oligonucleotídeo (10pmol) (tabela 1) e 1,25U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) em um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto) e extensão final a 72 °C por 5 minutos, de acordo com o descrito em 2003 por Birkenheyer e colaboradores.

A composição da mistura da PCR para piroplasmídeos foi formada com tampão 1X da Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1,5mM de MgCL<sub>2</sub>, 2nM de cada oligonucleotídeo (tabela 1), 0,25mM de dNTP, 1 U de taq DNA polimerase e cerca de 5ng de DNA da amostra para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 48°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à reação de PCR para diagnóstico de piroplasmídeos com os oligonucleotídeos BT1-F e BT1-R (Tabela 1), previamente desenvolvidos para amplificar uma região do gene 18S rRNA (aproximadamente 400 pb) comum aos gêneros *Babesia* e *Theileria* (390pb para *Babesia* spp, 410pb para *Theileria* spp (Criado-Fornelio et al 2003). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

As reações foram realizadas em dois termocicladores, no termociclador C1000 thermal cycler, ou no termociclador Biorad MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em em gel de agarose a 2.0%, corados com brometo de etídio (Vetec, Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) e observados em transiluminador fluorescente (UV transilluminator®, UVP LLC, Upland, CA).

Todas as reações da PCR utilizaram água ultra pura miliQ (estéril e desprovida de DNA) como controle negativo. Como controle positivo para as PCRs de piroplasmídeos foram utilizadas amostras de dois canídeos domésticos naturalmente infectados por *Babesia* spp confirmados por meio da microscopia óptica e na PCR.

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento das amostras, amplificação e detecção do produto amplificado foram realizados em quatro ambientes distintos, propriamente localizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (LMPM) do Hospital Veterinário da UnB, para diminuir a possibilidade de contaminação.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs, gene de origem, temperatura de melting, tamanho dos produtos de amplificação e referência bibliográfica

Oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo 5'-3'	Temperatura de melting (°C)	Gene	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>BTI-F</i>	GGT TGA TCC TGC CAG TAG T	48	18S rRNA	400	Criado-Fornelio et al 2003
<i>BTI-R</i>	GCC TGC TGC CTT CCT TA	48	18S rRNA	400	Criado-Fornelio et al 2003
<i>GAPDH F</i>	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	52	GAPDH	400	Birkenhey er et al 2003
<i>GAPDH R</i>	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	52	GAPDH	400	Birkenhey er et al 2003

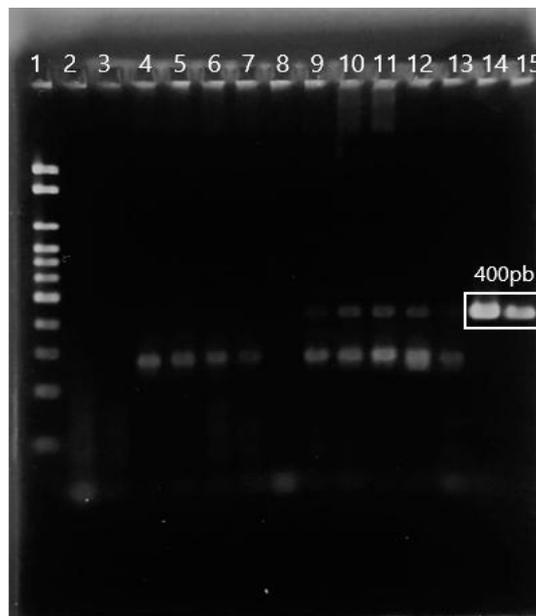
### **4.3 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com software (Microsoft Office Excel®) e a avaliação descritiva foi feita por cálculo da média e desvio padrão. O teste t-student com nível de significância de 0,05 foi utilizado para comparar valores médios nos grupos dos animais positivos e negativos na PCR.

## 5. RESULTADOS

Das 165 amostras de sangue total dos gatos domésticos residentes no Distrito Federal analisadas, nenhuma foi positiva na pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo, enquanto 51 (30,90%) demonstraram resultados positivos na realização da PCR (Figura 1) para investigação de piroplasmídeos utilizando os oligonucleotídeos mostrados na tabela 1.

Os resultados dos animais positivos e negativos por local de procedência estão demonstrados na tabela 2.



**Figura 2:** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o resultado da PCR para piroplasmídeos onde: 1-Marcador de peso molecular, 2- Controle negativo (água), 14 e

15- controle positivo, 12 e 13- animal positivo, 10 e 11- animal positivo, 8 e 9- animal positivo

**Tabela 2:** Resultado da PCR para infecção por piroplasmídeos por procedência dos animais testados

Local	Número de Positivos / (%)	Número de Negativos /(%)	Total de animais / (%)
Hvet Unb	5 (3,03)	17 (10,30)	22 (13,33)
MdG	44 (26,66)	87 (52,72)	131 (79,39)
GMMF	2 (1,21)	10 (6,06)	12 (7,27)
Total	51(30,90)	114 (69,09)	165(100)

Onde Hvet – Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, MdG – Mundo dos Gatos Clínica Veterinária, GMMF – Consultório Giovana Mazzoti Medicina Felina

Neste caso a maior porcentagem de animais positivos foi achada na Mundos dos Gatos Clínica Veterinária apenas devido ao maior número de amostras terem sido provenientes desse estabelecimento. Nesse estudo os três estabelecimentos atenderam felinos de várias regiões administrativas do Distrito Federal, não havendo diferença consistente entre as clínicas particulares e o Hospital Universitário em relação à região de procedência dos pacientes

Como observado na tabela 3, a técnica de PCR se mostrou mais sensível do que a visualização do hemoparasita por meio de microscopia óptica.

**Tabela 3:** Sensibilidade dos meios diagnósticos utilizados na identificação da infecção para piroplasmídeos.

Técnica	Animais positivos/ total de animais estudados	%
Microscopia óptica	0/165	0
PCR	51/165	30,9

Dos 51 animais positivos na PCR, 8 apresentaram queixa de ectoparasitas por parte de seus tutores, 10 declararam não ter observado presença ou não de ectoparasitas, e 33

declararam não haver presença de ectoparasitas em seus animais. Cabe ressaltar que em relação à presença de ectoparasitas, apenas 3 animais, dos 51 positivos, apresentaram ectoparasitas constatados por exame físico no momento da coleta de sangue. Esses 3 animais foram declarados portadores de ectoparasitas por seus tutores.

Dos mesmos 51 gatos positivos, 10 possuíam acesso à rua no momento da realização da pesquisa. Dezoito gatos positivos já haviam residido na rua ou abrigos, segundo seus tutores, 6 não souberam responder a pergunta e 27 declararam que seus animais nunca haviam residido na rua ou abrigos (tabelas 4 e 5).

**Tabela 4:** Queixa de ectoparasitas no momento da consulta, por parte dos tutores dos animais testados como positivos.

Presença de ectoparasitas	Número/total	%
Sim	8/51	15,68
Não	10/51	19,60
Não observado	33/51	64,70

**Tabela 5:** Hábitos de vida dos animais positivos, segundo tutores.

Hábito de vida	Número/total	%
Acesso à rua	10/51	19,60
Já residiram na rua ou abrigos	18/51	32,79
Não souberam responder	6/51	11,76
Nunca tiveram acesso à rua ou residiram em abrigo	27/51	52,94

Em relação às coinfeções com doenças retrovirais felinas (FIV e FeLV), 33 animais dos 51 positivos foram testados (Teste SNAP FIV/FeLV Combo IDEXX Laboratories), sendo 4 animais positivos para FeLV, nenhum positivo para FIV, e 29 negativos para FIV e FeLV (Tabela 6).

**Tabela 6:** Animais positivos coinfectados com doenças retrovirais felinas.

Co-infecção	Número/total testados	%
FIV positivos	0/33	0
FeLV positivos	4/33	12,12

As principais alterações hematológicas observadas nos animais positivos estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Frequência dos achados hematológicos nos hemogramas dos animais positivos

Achados hematológicos	Número/total	%
Anemia macrocítica normocrômica	1/51	1,96
Anemia normocítica normocrômica	2/51	3,92
Leucocitose	6/51	11,76
Leucopenia	5/51	9,80
Neutrofilia	10/51	19,60
Eosinofilia	3/51	5,88
Trombocitopenia	8/51	15,68

Os sinais clínicos que podem ser associados à infecção por piroplasmídeos segundo estudos anteriores (Mudaliar et al., 1950, Stewart et al., 1980, Hoover et al., 1994, Schoeman et al., 2001, Baneth et al., 2004, Birkenheuer et al., 2006b, Harvey et al., 2007, Snider et al., 2010, Baraboglia 2011, Carli et al., 2012) e apresentados pelos animais positivos neste estudo estão descritos na tabela 8.

**Tabela 8:** Sinais clínicos já associados com piroplasmose, e apresentados nos animais positivos para PCR

<b>Sinais Clínicos</b>	<b>Número/total</b>	<b>%</b>
Anemia	3/51	5,88
Icterícia	2/51	3,92
Pirexia (Febre)	1/51	1,96
Letargia/Apatia	8/51	15,68
Sem sintomatologia	23/51	45,09
Outros sinais clínicos	14/51	27,45

Obs: Outros sinais clínicos compreendem vômitos, diarreia, anorexia, prurido, claudicação, lesões cutâneas e convulsões

A tabela 9 demonstra os resultados de média, desvio padrão e comparação dos valores de hemograma entre os grupos de animais positivos e negativos para a PCR de piroplasmas. As médias dos grupos de animais positivos e negativos não apresentaram diferença significativa em nenhum parâmetro.

**Tabela 9:** Valores médios, desvio padrão e resultado do teste t de student ( $p>0,05$ ) dos parâmetros do hemograma completo apresentados entre os grupos de animais positivos e negativos para infecção por piroplasmas por meio da PCR

Parâmetros Hematológicos	Positivos(n=51)		Negativos(n=114)		Valores de referência	POS X NEG valor p
	Média	DP	Média	DP		
<b>VG (%)</b>	35,72	±7,29	36,64	±6,65	24-45	0,442
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/µl)</b>	9,47	±12,87	8,25	±1,57	5,0-10	0,551
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	12,11	±2,46	12,34	±2,15	8,0-15	0,540
<b>VCM (fl)</b>	45,25	±6,49	44,34	±2,95	39-55	0,223
<b>CHCM (%)</b>	33,80	±1,59	33,85	±1,99	30-36	0,892
<b>Leucócitos (µl)</b>	13.251	±11.812	10.944	±21.395	5.500-19.500	0,472
<b>Bastonetes</b>	173,98	±1174,03	48,49	±177,67	0-300	0,272
<b>Segmentados</b>	9342,90	±10667,92	8323,17	±7553,39	2.500-12.500	0,487
<b>Linfócitos</b>	2943,64	±2206,61	2776,56	±2626,93	1.500-7.000	0,693
<b>Monócitos (µl)</b>	148,23	±242,27	199,70	±514,58	0-850	0,497
<b>Eosinófilos (µl)</b>	550,96	±647,37	639,71	±747,32	0-1.500	0,465
<b>Basófilos</b>	92,23	±293,7	98,03	±298,95	Raros	0,908
<b>Proteínas (g/dL)</b>	7,47	±0,84	7,55	±0,72	6,0 -8,0	0,537

<b>Plaquetas</b>	299.076	±149.199	303.974	±128.915	195.000 624.000	0,832
------------------	---------	----------	---------	----------	--------------------	-------

Valores de referência: Jain, 1993.

A tabela 10 demonstra os resultados de média, desvio padrão e comparação dos valores das análises bioquímicas entre os grupos de animais positivos e negativos para a PCR de piroplasmas. Nem todos os animais do estudo tiveram exames bioquímicos realizados, o total de exames bioquímicos realizados por grupo de animais (positivos e negativos) está demonstrado na tabela.

**Tabela 10:** Valores médios, desvio padrão e resultado do teste t de student das análises bioquímicas apresentados entre os grupos de animais positivos e negativos para infecção por piroplasmas por meio da PCR

Parâmetros bioquímicos	Total de exames realizados/total de positivos	Positivos(n=51)		Total de exames realizados/total de negativos	Negativos(n=114)		Valores de referência	POS X NEG valor p
		Média	DP		Média	DP		
<b>Uréia (mg/dL)</b>	8/51	196,25	±189,26	28/114	90,89	±79,32	42,8-64,2	0,024*
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	45/51	2,19	±2,84	97/114	1,56	±0,92	0,8-1,8	0,053
<b>ALT(UI/L)</b>	29/51	75,06	±62,65	71/114	98,18	±140,24	6-83	0,396
<b>FA (UI/L)</b>	12/51	77,08	±75,30	40/114	56,79	±111,27	25-93	0,557
<b>GGT(UI/L)</b>	10/51	4,5	±3,3	19/114	3,07	±2,62	1-10	0,214
<b>Bilirrubinas (mg/dL)</b>	7/51	0,64	±0,79	9/114	0,15	±0,12	0,1-0,7	0,083
<b>Albumina (g/dL)</b>	7/51	3,18	±1,05	34/114	3,0	±0,8	2,1-3,3	0,793
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	7/51	7,67	±1,09	28/114	7,58	±0,95	5,4-7,8	0,830

Valores de referência: Kaneko et al, 1997

Na análise dos parâmetros bioquímicos, as médias dos grupos de animais positivos e negativos não apresentaram diferença significativa em nenhum parâmetro exceto mensuração da uréia ( $p=0,024$ ). As médias dos valores de FA, GGT, bilirrubinas, albumina e proteínas totais permaneceram na faixa dos valores de referência em ambos os grupos. As médias da mensuração de uréia permaneceram acima dos valores de referência em ambos os grupos. A média da creatinina apresentou-se acima dos valores de referência no grupo dos animais positivos, enquanto a média da ALT ficou acima dos valores de referência no grupo dos animais negativos.

## 6.DISSCUSSÃO

A ocorrência de 30,9% de gatos domésticos infectados por piroplasmídeos nesse estudo mostrou-se maior do que aquela encontrada em estudos anteriores da Europa e Ásia (Criado Fornelio et al, 2003; Simking et al, 2010). Simking et al (2010) detectaram a presença da espécie de babesia *B. vogeli* em gatos assintomáticos de Bankok. Essa espécie de babesia encontrada em cães é conhecida por ser menos patogênica e transmitida pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus*, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Uilemberg et al, 1989). A babesiose canina no Brasil é considerada endêmica e tem prevalência crescente em certas áreas do país (Bastos et al, 2004). Sabe-se que *B. vogeli* é uma espécie considerada frequente nos casos de babesiose canina no Brasil, já confirmado por métodos moleculares, e seu vetor *R. sanguineus* é altamente adaptado à áreas urbanas (Passos et al, 2005), podendo ser essa espécie responsável pela alta ocorrência de animais positivos nesse estudo.

Cabe ressaltar que essa alta ocorrência pode ter ocorrido devido a amostragem dos animais ter sido realizada por conveniência em hospitais e clínicas veterinárias, onde a maioria dos pacientes são levados para consulta e colheita de exames devido às enfermidades, o que pode ter aumentado a detecção destes agentes infecciosos e influenciado diretamente os resultados deste estudo. O maior número de animais positivos achados na Clínica Veterinária Mundo dos Gatos foi devido ao maior número de amostras de sangue provenientes de animais atendidos nessa clínica.

Em relação à presença de ectoparasitas ou hábito de vida dos animais positivos (se tem ou já tiveram acesso à rua, ou residiram na rua ou abrigos onde provavelmente estariam vulneráveis às picadas dos artrópodes vetores), uma porcentagem alta foi encontrada entre os tutores que declararam que seus animais não possuíram exposição a esses artrópodes

ou não souberam responder (tabelas 4 e 5). Essas informações, porém, se mostraram falhas na correlação com a infecção por piroplasmas. Essa falha, por exemplo, foi detectada em um animal positivo da raça Ragdoll onde sua tutora declarou nunca ter havido exposição do animal à ectoparasitas tampouco acesso do mesmo à rua, porém esse animal apresentava verminose causada por *Dipylidium* sp. Sendo esse um endoparasita transmitido aos felinos pela pulga, sugere-se que esse animal possuiu contato com ectoparasitas, possivelmente no gatil de onde foi comprado. Esta informação foi adquirida diretamente com a tutora deste animal, após os resultados deste estudo. Esse raciocínio pode ser aplicado aos outros animais que foram declarados como nunca antes expostos à ectoparasitas ou ambientes onde se encontram os mesmos.

Ainda em relação aos hábitos de vida, 52,7% dos animais positivos nesse estudo tinham acesso à rua ou já tiveram. Essa porcentagem pode ser ainda mais alta se consideramos as falhas dos tutores em responder o questionário, e esse achado corrobora com os resultados achados por Carli et al (2012) que encontraram 30% de prevalência de infecção por *Cytauxzoon* sp. em gatos de vida livre, em contraste com prevalência de 10% de infecção pelo mesmo piroplasmídeo em gatos de proprietários, que segundo os autores seriam menos expostos aos fatores de risco da infecção.

Há ainda a possibilidade de transmissão vertical, que pode justificar alguns resultados positivos desse estudo. Um estudo relata a ocorrência da babesiose canina transmitida via transplacentária em filhotes de cadela infectada, onde o óbito ocorreu em período inferior ao período de incubação da *B. canis*, e os achados de necropsia dos filhotes sugeriram infecção pelo hemoparasita (Breitschwerd et al, 1983). Simões et al (2011) também relataram infecção por *Babesia microti-like* em filhote de cão sem histórico de viagens ou exposição à ectoparasitas, onde a suspeita de transmissão vertical foi sugerida.

Na análise dos parâmetros de hemograma, todas as médias permaneceram na faixa dos valores de referência para a espécie e não houve diferença significativa em nenhum parâmetro. Esse resultado pode ser explicado pela possível infecção desses animais positivos por espécies de piroplasmas menos patogênicas, onde os felinos não manifestam sintomatologia clínica ou alterações hematológicas. Muitas vezes no caso de infecções por babesias tipicamente encontradas em cães (Criado Fornelio et al, 2003b), ou por serem portadores assintomáticos (Brown et al, 2008).

Dos animais positivos e anêmicos nesse estudo (3/51), um estava co-infectado com FeLV e apresentava anemia hemolítica no momento da coleta do sangue. O mesmo animal apresentava ectoparasitas, e tinha acesso à rua. Esse animal representa um potencial caso onde a piroplasmose, associada com outras infecções ou doenças concomitantes, no caso infecção pelo FeLV, pode agravar o quadro clínico do mesmo e piorar seu prognóstico. (Schoeman et al, 2001; Baneth et al, 2004, Carli et al, 2012).

Outro animal anêmico do estudo também estava co-infectado com FeLV, porém não manifestava sintomatologia clínica e a anemia foi um achado de *check up*. Esse animal, porém, residia na rua onde pode ter tido contato com os artrópodes vetores da piroplasmose felina.

O terceiro animal positivo e anêmico do estudo estava co-infectado com o vírus da Peritonite Infecciosa Felina, e apresentava insuficiência renal aguda em decorrência da deposição de complexos granulomatosos nos rins, como é comum em casos dessa doença viral. O mesmo animal apresentava acesso à rua, onde pode ter tido contato com os artrópodes vetores da piroplasmose felina. A anemia nesse caso também pode ser atribuída ao próprio processo inflamatório (Korman et al, 2013).

Com relação ao leucograma, novamente as médias de todos os parâmetros não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais positivos e negativos na PCR. Todos os parâmetros permaneceram dentro do intervalo de referência. Esse resultado é similar à relato previamente descrito por Baneth et al (2004) onde foi estudado um gato portador assintomático de *B. canis* sem qualquer alteração no hemograma. Schoeman et al (2001) concluíram em estudo onde foram avaliados parâmetros hematológicos de 56 gatos infectados com *B. felis* que, ao contrário do cão, a babesiose felina parece não causar neutrofilia tão pouco alterar parâmetros de leucograma, e que as alterações de leucograma nos gatos estudados foram devido à outras afecções. O mesmo pode ser concluído neste estudo, onde as alterações individuais dos leucogramas são devido à outras causas que não a infecção por piroplasmas, como por exemplo um animal positivo na PCR que apresentou 83.900 leucócitos ( $\mu$ l) sendo 73.832 neutrófilos segmentados e 8.390 bastonetes, quadro decorrente de um colangiocarcinoma com focos de necrose e abscesso pulmonar. Outro estudo realizado por Carli et al (2012) identificou 28 gatos infectados com *Cytauxzoon* spp e não houve associação significativa com alterações laboratoriais, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Na avaliação estatística das plaquetas, as médias dos grupos dos animais positivos e negativos foram semelhantes e dentro dos valores de referência, não havendo diferença significativa. Esse resultado pode ser explicado devido à baixa patogenicidade de espécies de piroplasmas encontrados nos felinos já descritos por outros autores (Criado Fornelio, 2012; Criado Fornelio et al, 2003b; Meinkoth et al, 2000; Brown et al, 2008), podendo essas mesmas espécies anteriormente descritas estarem parasitando os animais deste estudo.

Ainda em relação à avaliação das plaquetas, quando analisadas individualmente, observou-se trombocitopenia em oito animais, alteração comum em casos de infecção por piroplasmídeos em cães (Furlanello et al, 2005). Desses animais, três gatos apresentaram agregados plaquetários como observação do hemograma, alteração frequente em felinos devido ao estresse da colheita (Schoeman et al 2001), podendo justificar a trombocitopenia nesses casos. No entanto, cinco animais trombocitopênicos não possuíam observação de agregados plaquetários no hemograma, e a trombocitopenia observada pode ser decorrente da infecção pelos piroplasmas, embora esse não seja um achado consistente na infecção por piroplasmídeos nos felinos (Schoeman et al., 2001; Baneth et al., 2004). Esses cinco animais possuíam acesso à rua, dois possuíam relatos de ectoparasitas pelos tutores e um estava co-infectado com o vírus da FeLV, fator que favorece o aparecimento da sintomatologia da infecção pelos piroplasmídeos. Também não foi pesquisada a presença de co infecção por outros hemoparasitas nesses gatos trombocitopênicos, o que também pode ter influenciado nesse achado (Schoemann et al., 2001; Baneth et al., 2004, Criado-Fornelio et al., 2003a, Carli et al., 2012).

Na análise dos parâmetros bioquímicos, as médias da mensuração de uréia permaneceram acima dos valores de referência em ambos os grupos enquanto a média da creatinina apresentou-se acima dos valores de referência somente no grupo dos animais positivos. Foi encontrada diferença estatística entre os animais positivos e negativos ( $p=0,024$ ) (tabela 10). Esse resultado diverge do resultado encontrado por Schoeman et al (2001) onde não foi encontrado alterações significativas nos parâmetros de avaliação da função renal em felinos infectados com *B. felis*. Essa divergência provavelmente ocorreu devido aos animais do presente estudo terem doenças concomitantes e não somente infecção por piroplasmídeos. Schoeman et al sugerem ainda que a babesiose felina raramente causa comprometimento renal, ao contrário do que se sabe sobre a babesiose canina (Jacobson & Clark, 1994). Carli et al (2012) também não encontrou associação significativa na análise dos

parâmetros bioquímicos avaliados em animais assintomáticos infectados com *Cytauxzoon* sp. na Itália, sugerindo ser uma infecção menos patogênica do que as infecções por *C. felis* descritas nos EUA.

Camacho et al (2004) correlacionaram uma alta prevalência (36%) de azotemia em cães infectados com *B. microti-like*, sugerindo haver comprometimento renal decorrente de glomerulonefrite induzida pela infecção por esse microorganismo. Essa associação, no entanto, deve ser interpretada com cautela, pois a lesão renal nesses animais pode ter causa multifatorial (Camacho et al, 2004; Camacho, 2006).

Nesse estudo, as médias acima dos valores de referência podem apresentar um resultado não relacionado à infecção por piroplasmas, uma vez que esses exames geralmente só são solicitados pelo médico veterinário quando há suspeita clínica de enfermidade que altere esses parâmetros, como é o caso da mensuração da uréia e creatinina nos casos de doença renal crônica, afecção relativamente comum em gatos. Novamente, o fato da amostragem ter sido feita dentro de clínicas veterinárias pode ter induzido esse resultado.

Em relação aos sinais clínicos dos animais positivos (tabela 8), sinais clínicos como anemia, icterícia, pirexia e letargia/apatia foram similares às infecções por piroplasmas em estudos anteriores (Mudaliar et al., 1950, Stewart et al., 1980, Hoover et al., 1994, Schoeman et al., 2001, Baneth et al., 2004, Birkenheuer et al., 2006b, Harvey et al., 2007, Snider et al., 2010, Baraboglia 2011, Carli et al., 2012). Contudo, os animais assintomáticos ou com sinais clínicos não relacionados à piroplasmose representaram a maioria (52,57%), corroborando com a hipótese de que, ou os animais desse estudo podem estar infectados com espécies não patogênicas de piroplasmas (Criado Fornelio et al 2003b), ou os gatos podem ser portadores crônicos dos piroplasmas (Brown et al, 2008), ou ambos. Pode-se sugerir também que a piroplasmose felina pode ser uma doença onde os felinos não apresentam sintomatologia clínica salvo quando co-infectados com outros agentes (Schoeman et al, 2001; Baneth et al, 2004, Carli et al, 2012).

Cabe ressaltar que dos dois animais que apresentaram icterícia como sinal clínico nesse estudo, um foi diagnosticado com lipidose hepática e o outro com Peritonite Infecciosa Felina, o que explica a causa dessa sintomatologia. O único animal positivo que apresentou febre estava co-infectado com FeLV, podendo esse sinal ser explicado por um início de quadro de viremia ativa. Quanto aos oito animais que apresentaram letargia e apatia, esse é um sinal clínico extremamente inespecífico comum à quase todas as doenças dos

felinos domésticos. Mais uma vez, esse achado pode ter sido devido à amostragem desse estudo ter sido feita em hospital ou clínicas veterinárias, onde os animais são levados na maioria dos casos devido à presença de enfermidades.

## 7.CONCLUSÃO

A infecção por piroplasmídeos mostrou-se frequente em felinos domésticos do Distrito Federal, demonstrando uma ocorrência de 30,90%. No entanto, não foram encontrados achados hematológicos significativos em animais positivos, levando a crer que a piroplasmose não costuma aparecer como doença clínica nestes animais, possivelmente em decorrência destes serem cronicamente infectados ou parasitados por espécies ou linhagens menos patogênicas dos agentes. A técnica de diagnóstico molecular utilizada neste estudo mostrou-se eficiente no diagnóstico da infecção por piroplasmídeos nos felinos domésticos. Contudo, mostrou-se necessário o emprego de outras técnicas moleculares, como sequenciamentos genéticos ou PCR espécie-específicas, a fim de elucidar quais espécies de piroplasmas estão infectando esses animais.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, M. R., DENARDI, N. C. B., DE SOUSA, K. C. M., GONÇALVES, L. R., HENRIQUE, P. C., ONTIVERO, C. R. G. R., ... & DE SANTIS, A. C. G. A. (2014). Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, 5(5), 545-551.

BANETH, G.,KENNY,M.J.,TASKER,S.,ANUG,Y.,SHKAP,V.,LEVY, A., SHAW,S.E., 2004. Infection With a proposed new subspecies of Babesia canis, Babesia Canis subsp. presentii, in domestic cats. **J.Clin. Microbiol.** 42, 99–105.

BANETH, G., FLORIN-CHRISTENSEN, M., CARDOSO, L., SCHNITTGER, L., 2015. Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov. **Parasit Vectors** 8, 207.

BARABOGLIA, E.R., (2011). Hallazgo de un hemoparásito eritrocítico tipo Cytauxzoon felis en Felis catus domesticus, **Redvet**, 12, 1-29.

VALGAS E BASTOS, C. A. M. I. L. A., MOREIRA, S., PASSOS, L., & FRICHE, M. (2004). Retrospective Study (1998- 2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1026(1), 158-160.

BIRKENHEUER, A. J., LE, J. A., VALENZISI, A. M., TUCKER, M. D., LEVY, M. G., & BREITSCHWERDT, E. B. (2006). Cytauxzoon felis infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 228(4), 568-571.

BREITSCHWERDT, E. B., MALONE, J. B., MACWILLIAMS, P., LEVY, M. G., QUALLS, J. C., & PRUDICH, M. J. (1983). Babesiosis in the Greyhound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 182(9), 978-982.

BOSMAN, A.M., PENZHORN, B.L., VENTER, E.H., STEYL, J.C., OOSTHUIZEN, M.C. AND GOUS, T.A., 2013. Babesia lengau associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats. **Parasites & vectors**, 6(1), p.128.

BROWN, H. M.; LATIMER, K. S.; ERIKSON, L. E.; CASHWELL, M. E.; BRITT, J. O.; PETERSON, D. S.; Detection of persistent Cytauxzoon felis infection by polymerase chain reaction in asymptomatic domestic cats. **J Vet Diagn Invest** 20, 485-488, 2008.

CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA AS, GOETHERT HK, TELFORD SR III, SPIELMAN A: Azotemia and mortality among Babesia microtilike infected dogs. *J Vet Intern Med* 2004, 18:141-146

CAMACHO-GARCÍA AT: Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol* 2006, 138:97-102

CARLI, E., TROTTA, M., CHINELLI, R., DRIGO, M., SINIGOI, L., TOSOLINI, P., FURLANELLO, T., MILLOTTI, A., CALDIN, M., SOLANO-GALLEGU L. (2012). Cytauxzoon sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. **Veterinary Parasitology**, 183, 343-352.

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBACARRETERO, J.C., (2003b). Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, 114, 173-194.

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

ELLIOTT, J. AND BARBER, P. J. (1998), Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. **Journal of Small Animal Practice**, 39: 78–85

FURLANELLO, T., FIORIO, F., CALDIN, M., LUBAS, G., & SOLANO-GALLEGO, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy. **Veterinary parasitology**, 134(1), 77-85.

HARVEY, J.W., DUNBAR, M.R., NORTON, T.M., YABSLEY, M.J., (2007). Laboratory findings in acute Cytauxzoon felis infection in cougars (Puma concolor cougar) in Florida. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 38, 285-91.

HOOVER JP, WALKER DB, HEDGES JD: 1994, Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985–1992). **J Am Vet Med Assoc** 203:455–460

JACOBSON L S, CLARK I A 1994 The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *Journal of the South African Veterinary Association* 65: 134–145

KORMAN, R. M., Hetzel, N., Knowles, T. G., Harvey, A. M., & Tasker, S. A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 2, p. 81-90, 2013.

MAIA, L. M. P.; CERQUEIRA, A. M. F.; MACIEIRA, D. B.; SOUZA, A. M.; MOREIRA, N. S.; SILVA, A. V.; MESSICK, J. B.; FERREIRA, R. F. F.; ALMOSNYL, N. R. P.

Cytauxzoon felis and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v.22, n.2, 2013.

MUDALIAR, S. V., G. R. ACHARY, AND V. S. ALWAR. 1950. On a species of Babesia in an Indian wild cat (*Felis catus*). *Indian Vet. J.* 26:391–395

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..

SCHOEMAN, T., LOBETTI, R. G., JACOBSON, L. S., PENZHORN, B. L., (2001). Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. **Journal of the South African Veterinary Association**, 72, 4-11.

SIMÕES, P. B., CARDOSO, L., ARAÚJO, M., YISASCHAR-MEKUZAS, Y., & BANETH, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs—first report from Portugal and possible vertical transmission. **Parasites & vectors**, 4(1), 50.

SIMKING, P., WONGNAKPHEE, S., STICH, R. W., JITTAPALAPONG, S., (2010). Detection of *Babesia vogeli* in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand. **Veterinary Parasitology**, 173, 70-75.

SNIDER, T. A., CONFER, A. W., PAYTON, M. E., (2010). Pulmonary histopathology of *Cytauxzoon felis* infections in the cat. **Veterinary Pathology**, 47, 698-702.

STEWART, C. G., HACKETT, K. J. W., AND M. G. COLLETT. 1980. An unidentified Babesia of the domestic cat (*Felis domesticus*). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 51:219– 221

UILEMBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.*, v.1, p.33-40, 1989.

ZAHLER M, RINDER H, SCHEIN E, GOTHE R. Detection of a new pathogenic *Babesia* microti-like species in dogs. ***Vet Parasitol.*** 2000;89:241–8

**ANEXOS**

## Anexo 1: Questionário respondido pelos tutores dos animais

PROJETO PROF<sup>a</sup>. GIANE PALUDO (anexar aos exames de sangue de gatos)

**Nome do gatinho:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_ **RG:** \_\_\_\_\_

**Raça:** ( ) SRD ( ) Persa ( ) Siamês ( ) Ragdoll ( ) MaineCoon Outra: \_\_\_\_\_

**Sexo:** ( ) Macho ( ) Fêmea ( ) Macho castrado ( ) Fêmea castrada

**Local que reside:** ( ) Plano Piloto Outro: \_\_\_\_\_

**Tipo de moradia:** ( ) casa ( ) apartamento Outros: \_\_\_\_\_

**Tem acesso a rua:** ( ) sim ( ) não **Já residiu na rua ou abrigos:** ( ) sim ( ) não

**Contato com outros gatos:** ( ) sim ( ) não **Contato com cães:** ( ) sim ( ) não

**Presença de pulgas:** ( ) sim ( ) não ( ) não observado

**FIV:** ( ) não testado ( ) positivo ( ) negativo

**FeLV:** ( ) não testado ( ) positivo ( ) negativo

**Motivo da consulta (problema atual):** \_\_\_\_\_

**Doença crônica (quando houver):** \_\_\_\_\_

