



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

**LILIANE MARIA DO ROSARIO BATISTA**

***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASILIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2024**



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

**ALUNA: LILIANE MARIA DO ROSARIO BATISTA**

***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL**

**ORIENTADORA: GIANE REGINA PALUDO**

**PUBLICAÇÃO: NÚMERO DA DISSERTAÇÃO/ANO**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2024**

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

**LILIANE MARIA DO ROSARIO BATISTA**

***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL**

**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)**

**ORIENTADORA**

---

**Christine Souza Martins, Doutora (UnB)**

**EXAMINADOR INTERNO**

---

**Estevam Guilherme Lux Hoppe, Doutor (Unesp)**

**EXAMINADOR EXTERNO**

**BRASÍLIA/DF, 05 de DEZEMBRO de 2024**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BATISTA, Liliane Maria do Rosario. *Cytauxzoon brasiliensis* em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 68p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivada na Secretaria do Programa. A autora e o sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, deste que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

BATISTA, Liliane Maria do Rosário. *Cytauxzoon brasiliensis* em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024.

1. Cytauxzoonose. 2. Felinos domésticos. 3. Anemia 4. Diagnóstico.  
5. PCR.

*À minha falecida mãe, o meu maior exemplo  
de força e perseverança.*

“Porque o mundo te queima várias vezes, você  
sacode as cinzas e entra no próximo incêndio,  
sabendo que o fogo nunca chegará ao seu  
âmago.”

The Great

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha falecida mãe, Geralda Maria do Rosario, por tudo que sempre fez por mim, por acreditar que eu seria capaz de alcançar os meus sonhos e por constantemente me incentivar a persistir na caminhada rumo a esses sonhos. Fico triste por ela não poder estar aqui para ver mais esta conquista que eu finalmente estou alcançando. Obrigada por me mostrar como podemos ser fortes, até nos momentos mais difíceis. Sei que, depois de tudo o que já passamos, sempre terei forças para seguir em frente diante das adversidades da vida. Sempre te amarei, e muito obrigada por me ensinar a ser a pessoa que sou hoje.

Um agradecimento especial ao meu pai, Miguel A. Batista, que me proporcionou a possibilidade de aproveitar todas as oportunidades que surgiram. Se não fosse por você, o caminho para alcançar todos os meus sonhos teria sido muito mais difícil. Obrigada por me ensinar a importância de ser independente, de ser responsável e de sempre buscar um futuro melhor para mim.

Sou muito grata também à minha orientadora, Giane Regina Paludo. Obrigada por todo o aprendizado e por todas as oportunidades que me permitiram crescer na minha profissão! Agradeço de coração por ter sido minha orientadora durante todo esse tempo: já foram dois PIBICs, graduação, residência e agora o mestrado. Você, sem dúvida nenhuma, é uma orientadora incrível! Te admiro muito! É sempre muito bom ter exemplos de mulheres fortes e de sucesso.

Agradeço também ao meu chefe, Francisco Anilton Alves Araújo. Trabalhar com você nesse período facilitou muito a minha caminhada no mestrado. Obrigada por ser compreensivo e por incentivar nossos estudos! Agradeço por disponibilizar as amostras usadas nesta dissertação e por permitir que eu tivesse flexibilidade de horário para desenvolver este trabalho.

À Marcela Corrêa Scalon, que desde que comecei a entrar nesse mundo de pesquisa, na época do PIBIC, com toda a paciência e carinho me treinou e me ajudou. São anos em que tenho o prazer de ter te conhecido e trabalhado com você. Tenho um carinho muito grande por você e te admiro ainda mais! Obrigada por tudo!

Obrigada a todos os meus amigos que estiveram comigo todo esse tempo, me incentivando, ouvindo meus choros, minhas reclamações e, principalmente, comemorando comigo. Sei que sou uma pessoa muito intensa e emocionada, e saber que sou querida por vocês é muito importante para mim. Obrigada por tudo! Agradeço de coração todo o apoio e carinho nos momentos difíceis, que, bem sabemos, não foram poucos.

Ao meu colega de profissão, Matheus Almeida Duarte, por toda a ajuda que me deu na análise dos dados moleculares. Muito obrigada por arrumar um tempinho na sua agenda e disponibilizá-lo para me ajudar e ensinar. Sou muito grata por toda a sua ajuda!

Agradeço a todos os meus colegas de trabalho pela paciência e ajuda que me deram nesse período. Um agradecimento especial aos residentes, que me ajudaram muito.

Também agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste projeto.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus gatos da lua, lindos e maravilhosos: Luna, Ártemis e Diana. Cada um entrou na minha vida de uma forma diferente, mas todos foram o meu suporte emocional em todos os momentos difíceis que passei. Se não fosse por eles, talvez eu não tivesse tido a coragem e a força para continuar nessas lutas. Obrigada por existirem e por serem as criaturas mais fofas e carinhosas do mundo.



## ÍNDICE

|                                                                                                   | Páginas |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| RESUMO .....                                                                                      | xi      |
| ABSTRACT .....                                                                                    | xii     |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                            | xiii    |
| LISTAS DE TABELAS E QUADROS .....                                                                 | xiv     |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....                                                              | xv      |
| CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura .....                                                          | 1       |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                               | 2       |
| 1.1. OBJETIVOS GERAIS .....                                                                       | 3       |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                  | 3       |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                    | 4       |
| 2.1. Gato Doméstico .....                                                                         | 4       |
| 2.2. Apicomplexa .....                                                                            | 5       |
| 2.3. Piroplasmídeos .....                                                                         | 5       |
| 2.4. Ciclo Biológico .....                                                                        | 6       |
| 2.5. Epidemiologia .....                                                                          | 7       |
| 2.6. Transmissão .....                                                                            | 9       |
| 2.7. Cytauxzoonose .....                                                                          | 9       |
| 2.8. Diagnóstico .....                                                                            | 11      |
| 2.9. Tratamento .....                                                                             | 12      |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                               | 14      |
| CAPÍTULO 2 – <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil ..... | 20      |
| 1. RESUMO .....                                                                                   | 21      |
| 2. ABSTRACT .....                                                                                 | 22      |
| 3. INTRODUÇÃO .....                                                                               | 23      |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                      | 25      |
| 4.1. Amostras .....                                                                               | 25      |
| 4.2. Exames Hematológicos .....                                                                   | 25      |
| 4.3. Ensaios Moleculares .....                                                                    | 26      |
| 4.3.1. Extração .....                                                                             | 26      |
| 4.3.2. PCR do Gene GAPDH .....                                                                    | 26      |
| 4.3.3. PCR para Piroplasmídeos .....                                                              | 26      |
| 4.3.4. Análises das Coinfecções .....                                                             | 27      |
| 4.3.4.1. PCR para FeLV .....                                                                      | 27      |
| 4.3.4.2. PCR para FIV .....                                                                       | 27      |
| 4.3.4.3. PCR para hemoplasma .....                                                                | 28      |
| 4.3.5. Eletroforese .....                                                                         | 28      |
| 4.3.6. Sequenciamento e Análise Filogenética .....                                                | 29      |
| 4.4. Análises Estatísticas .....                                                                  | 30      |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....                                                                  | 31      |
| 5.1. Análise do Gene GAPDH .....                                                                  | 31      |
| 5.2. Análise das Infecções por Piroplasmídeos .....                                               | 31      |
| 5.3. Hematologia dos Piroplasmídeos .....                                                         | 38      |
| 5.4. Análise das Coinfecções .....                                                                | 41      |

|                                                    | Páginas |
|----------------------------------------------------|---------|
| 5.5. Hematologia das Coinfecções .....             | 42      |
| 6. CONCLUSÃO .....                                 | 45      |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                | 46      |
| CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÕES ..... | 51      |
| 1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....         | 51      |

## RESUMO

### ***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

Liliane Maria do Rosario Batista<sup>1</sup>, Giane Regina Paludo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

<sup>2</sup> Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

*Cytauxzoon spp.* (*Apicomplexa: Piroplasmida*) é um protozoário transmitido pela picada do carrapato durante o repasto alimentar, infectando felinos domésticos e silvestres em todo o mundo. Possui um ciclo de biológico complexo, sendo dividido em duas fases nos felinos: fase tecidual, associada aos quadros mais graves da cytauxzoonose, e que pode levar ao óbito do animal; e a fase eritrocitárias, associada aos quadros crônicos da infecção. No Brasil, infecções por *Cytauxzoon spp.* ocorrem em felinos silvestres e domésticos, com a maioria dos estudos demonstrando maiores ocorrências em felinos silvestres. Este trabalho teve como objetivo identificar a espécie de *Cytauxzoon* infectante em felinos domésticos no Distrito Federal, correlacionando-a com as alterações hematológicas e coinfeções. Foram analisadas 68 amostras de animais anêmicos e 11 amostras do banco de DNA do laboratório. As amostras foram submetidas a hemograma e PCR para os genes 18S rDNA e Cytb. As amostras dos animais anêmicos positivos para o gene 18S rDNA dos piroplasmídeos foram submetidas à PCR para hemoplasma, FIV e FeLV. Dez amostras positivas nas PCRs foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, demonstrando que os animais estavam infectados pelas espécies *Cytauxzoon brasiliensis* e *Babesia vogeli*. Foi observado que, dos 24 animais anêmicos positivos para infecção por *Cytauxzoon spp.*, 58,33% (14/24) apresentavam coinfeções, sendo 33,33% (8/24) por hemoplasmas, 41,67% (10/24) por FeLV e 8,33% (2/24) por FIV. A avaliação hematológica foi diferente ( $P < 0,05$ ) apenas nos animais com coinfeção por dois ou mais patógenos. Não foram observadas alterações hematológicas nas amostras do grupo do Banco de DNA, e identificação da infecção foi um achado laboratorial. O *Cytauxzoon brasiliensis* é a espécie infectante dos gatos domésticos no Distrito Federal, causando poucas alterações hematológicas.

**Palavras chaves:** Cytauxzoonose, felinos domésticos, anemia, diagnóstico, PCR

## ABSTRACT

### *Cytauxzoon brasiliensis* IN DOMESTIC CATS FROM FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

*Cytauxzoon* spp. (*Apicomplexa: Piroplasmida*) é um protozoário transmitido por meio da picada de carrapatos durante o repasto sanguíneo, infectando felídeos domésticos e selvagens em todo o mundo. Possui um ciclo biológico complexo, dividido em duas fases nos felídeos: a fase tecidual, associada aos casos mais graves de citauxzoonose, podendo levar ao óbito do animal; e a fase eritrocítica, relacionada a casos crônicos da infecção. No Brasil, infecções por *Cytauxzoon* spp. ocorrem em felídeos selvagens e domésticos, sendo que a maioria dos estudos demonstra maior ocorrência em felídeos selvagens. O presente estudo teve como objetivo identificar a espécie de *Cytauxzoon* infectando felídeos domésticos no Distrito Federal, correlacionando-a com alterações hematológicas e coinfeções. Foram analisadas 68 amostras de animais anêmicos e 11 amostras provenientes do banco de DNA do laboratório. As amostras foram submetidas à avaliação hemograma completa e à PCR para os genes 18S rDNA e Cytb. Amostras de animais anêmicos positivas para o gene 18S rDNA de piroplasmídeos foram também submetidas à PCR para hemoplasmas, FIV e FeLV. Dez amostras positivas nas PCRs foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, demonstrando que os animais estavam infectados pelas espécies *Cytauxzoon brasiliensis* e *Babesia vogeli*. Observou-se que, dentre os 24 animais anêmicos positivos para infecção por *Cytauxzoon* spp., 58,33% (14/24) apresentavam coinfeções, sendo 33,33% (8/24) por hemoplasmas, 41,67% (10/24) por FeLV e 8,33% (2/24) por FIV. A avaliação hematológica apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) apenas em animais com coinfeção por dois ou mais patógenos. Não foram observadas alterações hematológicas nas amostras provenientes do grupo do banco de DNA, sendo a identificação da infecção um achado laboratorial. Conclui-se que *Cytauxzoon brasiliensis* é a espécie que infecta gatos domésticos no Distrito Federal, causando poucas alterações hematológicas.

**Key Words:** Cytauxzoonosis, domestic felines, anemia, diagnosis, PCR

## LISTAS DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Capítulo 1</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Páginas |
| <b>Figura 1:</b> Ciclo biológico do <i>Cytauxzoon</i> spp. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7       |
| <b>Capítulo 2</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |
| <b>Figura 1:</b> Resultado da PCR para o gene GAPDH .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 31      |
| <b>Figura 2:</b> Resultado da PCR para o gene 18S de piroplasmídeos utilizando os oligonucleotídeos CY7548R, CY7549F, CYSSUR4 E CYSSUF2 .....                                                                                                                                                                                                                      | 32      |
| <b>Figura 3:</b> Árvore filogenética circular de máxima verossimilhança do gênero <i>Cytauxzoon</i> , com base em sequências de nucleotídeos de 18S rRNA (n = 126; 1.070 pb). A árvore foi enraizada utilizando Hepatozoon sp. (MH615006) como grupo externo .....                                                                                                 | 36      |
| <b>Figura 4:</b> Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gênero <i>Cytauxzoon</i> , com base em sequências de nucleotídeos de 18S rRNA (n = 126; 1.070 pb), na forma regular e com clados colapsados para facilitar a visualização das espécies do clado brasileiro. A árvore foi enraizada utilizando Hepatozoon sp. (MH615006) como grupo externo ..... | 37      |

## LISTAS DE TABELAS E QUADROS

|                                                                                                                                                                                  |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Capítulo 2</b>                                                                                                                                                                | Páginas |
| <b>Tabela 1:</b> Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.                                                                                                  | 29      |
| <b>Tabela 2:</b> Número total e porcentagem de animais positivos e negativos em cada PCR realizadas com os animais dos grupos do Banco de DNA e Animais Anêmicos .....           | 32      |
| <b>Tabela 3:</b> Resultados das identidades de alinhamento das amostras sequenciadas positivas para piroplasmídeos e comparadas com outras amostras depositadas no GenBank ..... | 34      |
| <b>Tabela 4:</b> Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais positivos e negativos para o gene 18S rDNA do grupo dos gatos anêmicos do laboratório OHV ..... | 39      |
| <b>Tabela 5:</b> Resultados das PCR para coinfeção por hemoplasma, FeLV e FIV dos gatos anêmicos positivos no gene 18S rDNA .....                                                | 42      |
| <b>Tabela 6:</b> Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais com e sem coinfeções e de cada coinfeção do grupo dos gatos anêmicos do laboratório OHV .....   | 43      |

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C: Graus Celsius

μL: Microlitros

μm: Micrometros

μMol: micromol

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID: Coagulação intravascular disseminada

COX3: Citocromo C oxidase subunidade III

Cytb: Citocromo B

DF: Distrito Federal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleotídeos

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

FeLV: Vírus da Leucemia Felina

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina

Gag: Antígeno de grupo específico

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

IFI: Imunofluorescência Indireta

ITS1: Espaço de Transcrição Interna 1

ITS2: Espaço de Transcrição Interna 2

Kg: Quilograma

LTR: Repetições terminais longas

Mg: Miligrama

*MgCl<sub>2</sub>*: Cloreto de magnésio

mM: Milimolar

ng: Nanograma

OHV: Laboratório One Health Veterinary

pb: Pares de base

PCR: Reação de polimerase em cadeia

Pdad: Pesquisa Distrital por Amostras de Domicílios

pmol: Picomol

PPT: Proteínas plasmáticas totais

q8h: A cada 8 horas

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribossomal

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal

SEMA/DF: Secretária de Estado do Meio Ambiente do Distrito Federal

sp.: Espécie

spp.: Espécies

UNB: Universidade de Brasília

USA: United States of America

VCM: Volume corpuscular médio

VG: Volume globular

VO: Via oral



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial de gatos está estimada em mais de 600 milhões, sendo que, no Brasil, essa população foi estimada em aproximadamente 30 milhões (PANAIT et al., 2021; ABINPET, 2024). Considerando o aumento desses animais nos lares e nas ruas, bem como a variabilidade climática, demográfica e comportamental, a identificação de agentes infecciosos e potenciais vetores torna-se cada vez mais importante (DÍAZ-REGAÑÓN et al., 2017; MAGGI & KRÄMER, 2019).

*Cytauxzoon* spp. (*Piroplasmida: Theileriidae*) é um importante agente infeccioso em felinos e ainda pouco estudado. Infecções por esse hemoprotozoário vem sendo reportadas em diversos países do mundo, embora a maioria dos casos em gatos domésticos seja relatada nos Estados Unidos. Os felinos silvestres, como o lince, são considerados os reservatórios. No Brasil, infecções por *Cytauxzoon* spp. ocorrem em felinos silvestres e domésticos, com a maioria dos estudos demonstrando maiores ocorrências em felinos silvestres (JAKOB & WESEMEIER, 1996; KETZ-RILEY et al., 2003; ÁNDRE et al., 2009; GALLUSOVÁ et al., 2016; JALOVECKA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2021; PANAIT et al., 2021; ÁNDRE et al., 2022).

*Cytauxzoon* spp. possui um ciclo de biológico complexo, apresentando duas fases no hospedeiro invertebrado (assexuada e sexuada) e uma fase assexuada no hospedeiro vertebrado. A fase assexuada nos felinos compreende uma fase tecidual, associada aos quadros mais graves da cytauxzoonose, em que o gato pode apresentar sinais inespecíficos, como febre, inapetência, letargia, depressão e, em casos mais graves, falência de múltiplos órgãos devido a obstruções vasculares causadas por macrófagos infectados, podendo resultar na morte do animal; e a fase eritrocitária, associada aos quadros crônicos da infecção (REGAÑÓN et al., 2017; HARTLEY et al., 2020; DÍAZ-RAIMUNDO et al., 2021; ÁNDRE et al., 2022). Apesar do ciclo biológico ainda não ser completamente compreendido, sabe-se que a transmissão desse hemoprotozoário ocorre pela picada de carrapato (JAKOB & WESEMEIER, 1996; ÁNDRE et al., 2009; GALLUSOVÁ et al., 2016; DÍAZ-REGAÑÓN et al., 2017; JALOVECKA et al., 2018; HARTLEY et al., 2020).

O diagnóstico normalmente é feito pela associação dos sinais clínicos do paciente com a pesquisa do hemoparasita e com o auxílio de técnicas moleculares, como a reação de polimerase em cadeia (PCR). A visualização de piroplasmas nas hemácias por microscopia óptica é amplamente utilizada, contudo é menos sensível que a PCR (WANG et al., 2017; REICHARD et al. 2021). Atualmente, o tratamento recomendado é a associação de atovaquona e azitromicina, juntamente com terapia de suporte. A conscientização sobre infecção por *Cytauxzoon* spp. é fundamental devido ao custo elevado do tratamento e ao risco que a infecção pode causar à saúde do animal. Por esse motivo, o emprego de técnicas moleculares para a identificação de *Cytauxzoon* spp. torna-se cada vez mais importante para auxiliar no diagnóstico e tratamento de pacientes infectados (SCHEREEG et al. 2013; GALLUSOVÁ et al., 2016; KHANA et al., 2018; WIKANDER et al., 2020; GONÇALVES et al., 2021; REICHARD et al. 2021; ÁNDRE et al., 2022; ZIEMAN et al., 2023).

### **1.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo identificar gatos infectados por *Cytauxzoon* spp. no Distrito Federal.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Identificar e caracterizar molecularmente a espécie de *Cytauxzoon* infectante dos felinos domésticos no Distrito Federal.
- Correlacionar a infecção por *Cytauxzoon* spp. e a ocorrência de anemia e outras alterações hematológicas.
- Identificar a ocorrência de possíveis coinfeções de *Cytauxzoon* spp. com outros agentes e suas alterações laboratoriais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gato Doméstico

Os gatos domésticos (*Felis catus*) são carnívoros estritos e têm como ancestral o *Felis silvestris*, que habitava regiões da Europa e África. Acredita-se que a sua domesticação tenha iniciado há aproximadamente 10 mil anos, período em que os gatos mantinham uma relação mutualística com os humanos, predando roedores em troca de alimentos e abrigos. Com o passar do tempo, os gatos passaram por diversos processos de seleção evolutiva, tanto naturais quanto artificiais, até chegarem à espécie que conhecemos hoje. Esses felinos são animais bem adaptados ao ambiente humano e, gradualmente, foram estabelecendo uma convivência mais próxima aos seres humanos, o que levou à popularização da criação dos gatos domésticos em diversos países (CAEIRO et al., 2017; VERBRUGGHE & HESTA, 2017; MACHADO, 2019; CHEN, 2023).

É possível classificar o estilo de vida dos gatos de duas formas. A primeira forma de classificação é: gatos com criação exclusivamente domiciliada (*indoor*), em que os animais encontram-se completamente confinados; gatos domiciliados dentro e fora da residência (*indoor-outdoor*), com acesso a quintais e varandas; gatos não confinados (*free-ranging*), com livre acesso ao ambiente externo; e gatos ferais (feral), que são aqueles de vida livre, sem a presença de um tutor. A segunda forma de classificação inclui: animais domiciliados (que abrangem os dois primeiros grupos da classificação anterior), gatos semidomiciliados (animais que possuem um tutor, mas têm livre acesso ao ambiente externo) e os gatos não domiciliados (animais ferais que não possuem tutores (MACHADO, 2019).

Estima-se que existam mais de 600 milhões de gatos no mundo. O Brasil é considerado o terceiro país com a maior população de animais de estimação, totalizando aproximadamente 157 milhões de animais e destes, 30 milhões de gatos domésticos (PANAIT et al., 2021; ABINPET, 2024). Segundo o Censo do IBGE, em 2019, aproximadamente 14 mil lares brasileiros possuíam algum gato. No Distrito Federal (DF), foi iniciada uma Pesquisa Distrital por Amostras de Domicílios (Pdad), realizada pela Subsecretaria de Proteção Animal (Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Distrito Federal – SEMA/DF), com o objetivo de levantar a população de cães e gatos. Até o momento, essa pesquisa estimou que 60% dos habitantes do DF possuem animais de estimação e que cerca de 11,1% das casas participantes da entrevista têm gatos como animais de estimação (SEMA/DF, 2024).

Apesar da elevada população de gatos no mundo, os registros de hemoparasitoses de felinos na literatura são relativamente escassos quando comparados aos registros de cães. Com o aumento crescente da população de felinos domésticos, tem crescido o interesse por estudos sobre doenças infecciosas e parasitos transmitidos por vetores em gatos (GONÇALVES, 2021; PANAIT et al., 2021). As doenças transmitidas por vetores possuem ampla distribuição e, devido às mudanças climáticas e ambientais, estão aumentando. Infelizmente, infecções transmitidas por esses vetores em gatos têm recebido menos atenção em comparação com os cães. Cabe salientar que gatos com algum

nível de acesso ao ambiente externo ou que vivem em abrigos estão susceptíveis a contrair doenças transmitidas por vetores (ANDRÉ et al., 2017; DE MELO et al., 2023).

## 2.2. Apicomplexa

Os parasitos do filo *Apicomplexa* são assim denominados devido à presença de um complexo apical, uma estrutura que contém organelas secretoras e elementos do citoesqueleto (PACHECO et al., 2020). São microorganismos eucariotos unicelulares, predominantemente intracelulares obrigatórios, com capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, tanto vertebrados quanto invertebrados (FRÉNAL et al., 2017; BOISARD & FLORENT, 2020; PACHECO et al., 2020).

São protozoários, com aproximadamente 350 gêneros descritos. Os parasitos deste filo possuem grande importância na medicina humana e veterinária, embora apenas alguns tenham sido mais intensamente estudados (FRÉNAL et al., 2017; BOISARD & FLORENT, 2020; PACHECO et al., 2020;). O filo *Apicomplexa* é composto por quatro grupos: coccídeos, gregarinas, hemosporídeos e piroplasmídeos, cujas espécies compartilham diversas características estruturais conservadas (MORRISON, 2009; BERNÁ et al., 2021). Esses parasitos apresentam um ciclo de vida complexo, alternando entre estágios assexuados e sexuados em seus hospedeiros (FRÉNAL et al., 2017; BOISARD & FLORENT, 2020).

## 2.3. Piroplasmídeos

A ordem *Piroplasmida* inclui espécies dos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*. Os piroplasmídeos possuem importância clínica e econômica por infectarem humanos, animais de produção, animais selvagens e animais de companhia, causando-lhes diversas doenças. A taxonomia clássica dessa ordem foi baseada no mecanismo de transmissão do vetor carrapato, nos tipos células infectadas no hospedeiro, na morfologia do parasito e na preferência pelo hospedeiro vertebrado. Contudo, as relações taxonômicas dessa ordem ainda permanecem ambíguas (SCHEREEG et al., 2016; SCHNITTGER, et. al., 2022).

Os gêneros *Cytauxzoon* e *Theileria* estão intimamente relacionados. Inicialmente, acreditava-se que a principal diferença entre eles estava no tipo celular em que ocorria a esquizogonia: enquanto a esquizogonia do *Cytauxzoon* ocorria em monócitos e macrófagos, a esquizogonia da *Theileria* ocorria em linfócitos. Contudo, estudos recentes revelam que esse gênero também infecta macrófagos (SCHEREEG et al., 2016; WANG et al., 2017).

O gênero *Cytauxzoon* possui a seguinte classificação taxonômica: filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoasida*, subclasse *Hematozoa*, ordem *Piroplasmida*, família *Theileriidae*. Até o momento, seis espécies de *Cytauxzoon* foram identificadas: *Cytauxzoon felis* na América do Norte; *C. manul* na Ásia; *C. europaeus*, *C. otrantorum* e

*C. banethi* na Europa; e *C. brasiliensis* no Brasil (WANG et al., 2017; PANAIT et al., 2021; WIKANDER & REIF, 2023; DUARTE et al., 2024).

As espécies e a nomenclatura desses protozoários têm sido temas de debates por mais de uma década, devido às características morfológicas indistinguíveis dos merozoítos intracelulares, comumente chamados de piroplasmas. Esses merozoítos possuem, geralmente, um diâmetro de 1 a 2  $\mu\text{m}$  e podem apresentar diversas formas distintas, sendo a mais frequentemente observada o formato de “anel de sinete” (WANG et al., 2017).

## 2.4. Ciclo Biológico

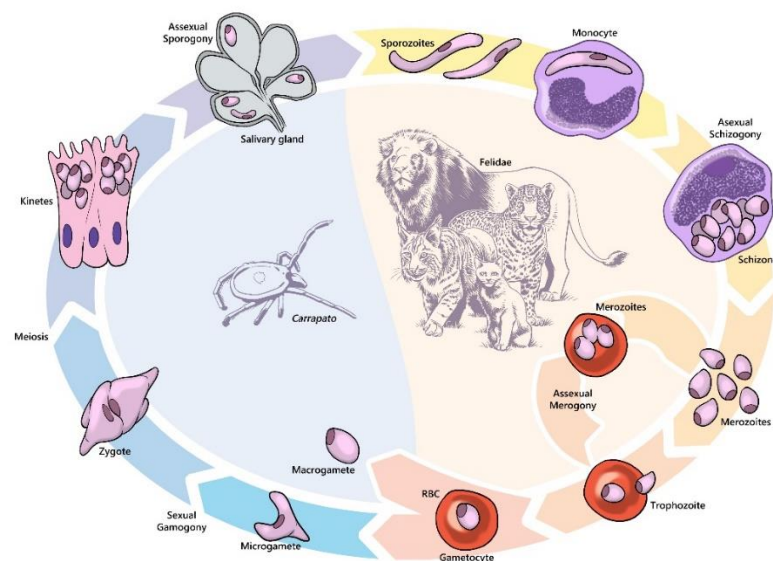
*Cytauxzoon* spp. apresenta um ciclo biológico complexo, que inclui reprodução assexuada nos hospedeiros felinos e reprodução assexuada e sexuada nos carrapatos (KHANA et al., 2018; WIKANDER et al., 2020). No felino, o parasito apresenta três estágios: esporozoítos, a fase infectante transmitida pelo carrapato; esquizontes, que corresponde à fase em que o parasito, durante a fase aguda da doença, se desenvolve nos macrófagos teciduais; e, por fim, merozoítos, que são liberados dos esquizontes e infectam as hemácias durante as parasitemias crônicas (KHANA et al., 2018).

O ciclo biológico (**Figura 1**) inicia-se com o esporozoíto sendo introduzido no felino durante o repasto do carrapato, por meio de sua saliva. Após entrar na corrente sanguínea, o esporozoíto dirige-se para infectar os monócitos e macrófagos, onde inicia a sua replicação assexuada (esquizogonia), formando diversos merozoítos. Essa replicação resulta no aumento do volume celular até o rompimento da célula, liberando os merozoítos na corrente sanguínea. Esses merozoítos infectam as hemácias dos felinos, onde iniciam uma nova replicação assexuada (merogonia) ou podem se diferenciar em gametócitos. Quando um carrapato realiza o repasto em um felino infectado, ingere os gametócitos, que no vetor se desenvolvem por reprodução sexuada, formando zigotos no lúmen intestinal do carrapato. Os zigotos transformam-se em cinetos móveis, que migram para as glândulas salivares, onde realizam reprodução assexuada, produzindo esporozoítos prontos para infectar um novo hospedeiro vertebrado (WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2020).

De modo resumido, nos felinos, o ciclo do *Cytauxzoon* spp. divide-se em duas fases: uma fase intraeritrocitária e outra tecidual. A fase tecidual ocorre quando os esquizontes se desenvolvem em macrófagos e monócitos, sendo essa fase mais crítica da patologia, pois é nesse estágio que os animais apresentam os quadros mais graves da doença. A fase eritrocitária ocorre quando o parasito infecta os eritrócitos, estando esta fase relacionada a sinais clínicos mais brandos (ANDRÉ et al. 2009; RAIMUNDO et al., 2021).

No vetor, *Cytauxzoon* spp. apresenta uma transmissão transestadial, ocorrendo através das ecdises, o que garante que os esporozoítos possam infectar novos hospedeiros nos repastos subsequentes do carrapato. Além disso, ainda não existem evidências de

transmissão transovariana (SCHEREEG et al., 2016; WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2020).



**Figura 1:** Ciclo biológico do *Cytauxzoon* spp. O ciclo inicia-se com a inoculação do esporozoíto durante o repasto do carrapato. Esse esporozoíto infecta os macrófagos, onde se desenvolve em esquizontes e produz, em seu interior, inúmeros merozoítos. Com o rompimento do macrófago infectado, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e passam a infectar os eritrócitos. Nas hemácias, alguns desses merozoítos se diferenciam em gametócitos, que, durante o repasto do carrapato, são ingeridos. No vetor, os gametócitos sofrem reprodução sexuada, transformando-se em zigotos no lúmen intestinal. Esses zigotos migram para as glândulas salivares, onde realizam reprodução assexuada, transformando-se em esporozoítos prontos para iniciar um novo ciclo. (Adaptado: WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2019; WIKANDER et al., 2023)

## 2.5. Epidemiologia

O primeiro relato de uma espécie de *Cytauxzoon* foi feito na África do Sul por Neitz e Thomas, em 1948, ao descreverem um quadro de cytauxzoonose em um pequeno antílope africano, que recebeu o nome de *Cytauxzoon sylvicaprae*. Poucos anos depois, novos relatos de infecções surgiram em outros animais ungulados, com a identificação de novas espécies nesses hospedeiros (JAKOB & WESEMEIER, 1996; PANAIT et al., 2021). Em 1976, foi relatado o primeiro caso da doença em um gato doméstico no Missouri, Estados Unidos (EUA), sendo posteriormente identificado o parasito, denominado *Cytauxzoon felis* (JAKOB & WESEMEIER, 1996; KHANA et al., 2018; PANAIT et al., 2021). A partir deste primeiro relato, infecções por espécies de

*Cytauxzoon* spp. foram reportadas e identificadas em diversas regiões do mundo, incluindo África, Ásia, Europa e Américas (KHANA et al., 2018; ZOU et al, 2019; FAGUNDES-MOREIRA, 2022).

Existem vários relatos de infecção por *Cytauxzoon* spp. em felinos silvestres e domésticos nos Estados Unidos e, a partir dos anos 2000, casos de infecções por esse hemoprotozoário passaram a ser relatados em diversas outras regiões do mundo (ANTOGNONI et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). No Brasil, o caso mais antigo registrado de infecção por *Cytauxzoon* spp., ocorreu em 1998, quando dois leões residentes no Zoológico do Município de Volta Redonda, Rio de Janeiro, apresentaram quadros sugestivos de cytauxzoonose. Posteriormente, as amostras desses animais foram submetidas a exames moleculares, que confirmaram a infecção por *Cytauxzoon* spp. (PEIXOTO et al. 2007).

Informações acerca da prevalência de infecção por *Cytauxzoon* spp. ainda apresentam limitações. Nos EUA, onde *Cytauxzoon felis* é amplamente estudado, o lince é considerado o principal reservatório desse parasito, com prevalência variando entre 60% a 79% em alguns estados do país. Estudos demonstram que, no Brasil, os felinos silvestres também apresentam uma maior prevalência de infecção por *Cytauxzoon* spp. (FURTADO et al., 2017; ZOU et al, 2019; SILVA et al., 2020; RAIMUNDO et al., 2021; ZIEMAN et al., 2023). Nos Estados Unidos, diversos estudos relatam uma variação de 0,3% a 25,8% na prevalência de *Cytauxzoon felis* em gatos saudáveis. Na Província de Yunnan, na China, foi demonstrada uma prevalência de 21,5% nos gatos domésticos. Já no Brasil, alguns estudos têm relatado a ocorrência de *Cytauxzoon* spp. em gatos domésticos em diferentes estados, com prevalências observadas de 4,8% em Rondônia, 0,6% no Mato Grosso do Sul, 3,3% em Santa Catarina, 24,4% em São Paulo, 41,9% em Minas Gerais, 0,5% no Rio de Janeiro e 7,2% no Distrito Federal (OLIVEIRA et al., 2022)

Apesar da grande importância da cytauxzoonose para os gatos, essa doença é pouco estudada no Brasil. Existem poucos estudos sobre *Cytauxzoon* spp., sendo a maioria focada em casos de infecção em felinos silvestres. É importante destacar que a infecção em gatos domésticos pode ser fatal, e animais aparentemente saudáveis podem atuar como portadores crônicos e reservatórios do parasito, constituindo, assim, uma fonte de infecção para o vetor. Devido a essa situação, a conscientização dos médicos veterinários e da população é fundamental (WANG et al., 2017; RAIMUNDO et al., 2021).

Dessa forma, os relatos de casos de cytauxzoonose, juntamente com a conscientização pública sobre a doença, contribuem para uma melhor compreensão da enfermidade e dos fatores de risco associados aos pacientes, além de fornecer informações que podem auxiliar na mitigação da transmissão entre as populações de gatos (WIKANDER et al., 2020). Adicionalmente, é necessário a realização de mais estudos envolvendo animais clinicamente saudáveis, a fim de determinar o papel desses indivíduos como portadores e reservatórios de *Cytauxzoon* spp. (RAIMUNDO et al., 2021).



## 2.6. Transmissão

*Cytauxzoon* spp. é um hemoparasito transmitido por um vetor hematófago, o carrapato (ANDRÉ et al. 2009; ZOU et al, 2019; WIKANDER et al., 2020). Os carrapatos da família *Ixodidae* são relatados como responsáveis pela transmissão do parasito. Atualmente, duas espécies de carrapatos foram associadas como vetores do *Cytauxzoon felis* nos Estados Unidos: *Dermacentor variabilis* (carrapato-americano-do-cão) e *Amblyomma americanum* (carrapato-estrela-solitária). Contudo, ainda permanece desconhecido quais populações de vetores estão envolvidas na transmissão do *Cytauxzoon* spp. nos demais países (ZIEMAN et al, 2017; WIKANDER et al., 2020; ZIEMAN et al., 2020; ZIEMAN et al., 2023).

Os casos de infecções por *Cytauxzoon* spp. aumentam nas regiões de clima temperado no final da primavera, período em que o carrapato está mais ativo. Quanto maior a carga parasitária, maiores são as chances do vetor se infectar durante o repasto sanguíneo, permitindo que o parasito se estabeleça nos órgãos específicos do vetor e amadureça para infectar um novo hospedeiro (ZIEMAN et al., 2020).

Alguns parasitos transmitidos por vetores apresentam níveis de parasitemia sincronizados com os horários de pico de atividade desses vetores, como observado nas espécies de *Leucocytozoon*, *Plasmodium* e *Trypanosoma*. Acredita-se que esses parasitos possuam mecanismos capazes de gerar sinais biológicos no hospedeiro, associados à atividade do vetor, uma vez que as mudanças nos níveis de parasitemia ocorrem antes do período de atividade do vetor (ZIEMAN et al., 2020).

A transmissão do parasito ocorre quando o vetor realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado e, posteriormente, se alimenta em outro hospedeiro. Estudos sugerem que a capacidade de ingestão de sangue em cada fase do desenvolvimento do carrapato, associada ao grau de parasitemia por *Cytauxzoon felis* no hospedeiro, pode influenciar as chances de o carrapato adquirir o parasito, aumentando-as ou diminuindo-as. Além disso, os autores ressaltam que, como os carrapatos adultos geralmente se alimentam apenas em um único hospedeiro, indivíduos não infectados durante as fases de ninfa ou larva não contribuiriam para o ciclo de vida de *C. felis* (ZIEMAN et al., 2020).

## 2.7. Cytauxzoonose

Desde o primeiro relato, há aproximadamente 50 anos, a cytauxzoonose tem sido considerada uma doença responsável por casos graves e fatais em gatos domésticos. Em contraste, nos felinos silvestres, a infecção tem sido, em sua maioria, associada a quadros assintomáticos (FURTADO et al., 2017; ZIEMAN et al, 2017; ZOU et al, 2019; YANG et al., 2023). No entanto, estudos recentes têm demonstrado uma inversão dessa tendência, com relatos de casos graves em felinos silvestres e quadros assintomáticos em gatos domésticos (FURTADO et al., 2017; WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2020). Estudos americanos revelam que animais não tratados podem apresentar altas taxas de mortalidade e que, quando empregado um tratamento, essa taxa pode ser reduzida para

até 40% (COHN et al., 2011; SCHEREEG et al. 2013; ZIEMAN et al, 2017; ZIEMAN et al., 2020; ZIEMAN et al., 2023).

A doença apresenta sinais inespecíficos, sendo comum os gatos manifestarem febre alta, icterícia, anemia, dispneia, anorexia, vômitos, desidratação, letargia, inapetência, depressão, crise hemolítica, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, taquicardia e palidez das mucosas (WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2020; REICHARD et al. 2021; SLEZNIKOW et al., 2021; ZIEMAN et al., 2023).

Os sinais clínicos da doença na fase aguda ocorrem durante a esquizogonia, afetando principalmente pulmões, fígado, baço e linfonodos. Com a progressão da infecção, o animal pode evoluir para óbito em decorrência das lesões provocadas pelas citocinas inflamatórias em diversos órgãos, pneumonia intersticial, coagulação intravascular disseminada (CID) e lesões de hipóxia (WIKANDER et al., 2020). A CID pode se manifestar em alguns felinos devido à replicação do parasito (esquizogonia) nas células fagocíticas mononucleares (macrófagos). Quando infectadas, essas células aumentam de tamanho, o que pode resultar na obstrução dos vasos sanguíneos (ZIEMAN et al., 2023). Além disso, os macrófagos infectados expressam alterações e produzem citocinas inflamatórias que promovem sua adesão ao endotélio vascular, agravando o processo de obstrução. Esse mecanismo contribui para danos teciduais significativos e falência dos órgãos (WANG et al., 2017; ZIEMAN et al., 2023).

Na avaliação dos exames hematológicos e bioquímicos, é comum observar citopenias em geral, neutrofilias com desvio à esquerda, alterações tóxicas nos neutrófilos, hipoalbuminemia, hiperglicemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, tempo de protrombina prolongado e aumento das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (WANG et al., 2017; WIKANDER et al., 2020; REICHARD et al. 2021). Inicialmente, a anemia observada é do tipo não regenerativa durante a fase de esquizogonia, podendo evoluir para anemia regenerativa com o avanço da doença. A anemia é atribuída a hemólise, que pode ocorrer sem o aumento significativo de bilirrubina e sem a supressão da medula óssea. Em animais com leucopenia e/ou neutropenia, pode ser visualizados grandes linfócitos granulares (REICHARD et al. 2021). Além disso, durante a avaliação hematológica, é possível visualizar piroplasmas e/ou macrófagos contendo esquizontes nos esfregaços sanguíneos (WIKANDER et al., 2020; REICHARD et al. 2021).

Há evidências de que alguns gatos domésticos infectados por *Cytauxzoon* spp. permanecem assintomáticos e podem nunca desenvolver a forma clínica da doença. Nesses casos, o diagnóstico frequentemente ocorre antes da manifestação de qualquer sinal clínico (ZOU et al, 2019; ZIEMAN et al., 2023). Estudos também indicam que, após sobreviver à doença, os gatos podem evoluir para a cura clínica, porém, mesmo após o tratamento, podem permanecer cronicamente infectado por anos. Esse tipo de infecção crônica também foi observado em lince infectados por *Cytauxzoon felis* (ZIEMAN et al, 2017; ZIEMAN et al., 2020; RAIMUNDO et al., 2021; ZIEMAN et al., 2023). Animais assintomático cronicamente infectados podem desempenhar um papel significativo na epizootiologia do parasito, atuando como potenciais reservatórios e fontes de infecção para o vetor, contribuindo, assim, para a transmissão do parasito a outros gatos (RAIMUNDO et al., 2021; ZIEMAN et al., 2023).

Com o avanço dos estudos, tem-se observado que gatos portadores de *Cytauxzoon* spp. são mais comuns do que se imaginava anteriormente. Além disso, a descoberta de novas espécies em países da Europa, Ásia e América do Sul tem intensificado a preocupação com essa doença, levando a um aumento gradativo de interesse científico e clínico sobre o tema (WIKANDER et al., 2020; YANG et al., 2023).

## 2.8. Diagnóstico

Atualmente, existem duas formas de diagnóstico disponíveis: a pesquisa do hemoparasita em esfregaço sanguíneo e o diagnóstico molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Embora amplamente utilizada, a detecção de piroplasmas em hemácias por microscopia óptica apresenta sensibilidade limitada. Além dos métodos moleculares, a técnica de hibridização *in situ* tem sido empregada em amostras de tecido para visualização e confirmação da presença de *Cytauxzoon felis* (WANG et al., 2017; REICHARD et al. 2021). Outras metodologias, como a detecção de anticorpos por Imunofluorescência Indireta (IFI), também foram testadas experimentalmente. No entanto, essas técnicas ainda não estão disponíveis comercialmente para diagnóstico, e suas especificidades ainda não foram comprovadas (WANG et al., 2017).

O diagnóstico geralmente é realizado pela associação entre os sinais clínicos apresentados pelo paciente e a pesquisa do parasito, visando à identificação de hemácias contendo merozoítas e/ou macrófagos com esquizontes em esfregaços sanguíneos ou em amostras obtidas por punção aspirativa de órgãos como baço, fígado, linfonodos ou pulmões. No entanto, a ausência de visualização durante a pesquisa não deve ser utilizada como critério para descartar a doença. Em casos de suspeita persistente, recomenda-se a repetição diária da pesquisa do hemoparasita. Além disso, é importante ressaltar que *Cytauxzoon* spp. pode apresentar uma morfologia variada, o que dificulta diferenciá-lo de outros piroplasmídeos, de *Mycoplasma* spp. (sinônimo *Haemobartonella felis*), de corpúsculos de Howell-Jolly, de precipitado de corante ou até mesmo de artefatos decorrentes da secagem da água (WANG et al., 2017).

Outra abordagem diagnóstica é o uso da PCR, uma técnica molecular que se destaca por sua alta sensibilidade e especificidade. Os principais genes-alvos utilizados nessa técnica incluem: 18S rRNA, Espaço de Transcrição Interna 1 (ITS1), ITS2, citocromo B (Cytb) e citocromo C oxidase subunidade III (cox3). Entre esses, a PCR direcionada ao gene cox3 tem demonstrado maior sensibilidade em comparação à PCR baseada no gene 18S rRNA. A PCR também apresenta sensibilidade superior à pesquisa de hemoparasita (WANG et al., 2017; REICHARD et al. 2021). Ao associar a PCR com o sequenciamento do DNA torna-se possível fazer a diferenciação do *Cytauxzoon* spp. das espécies dos gêneros *Theileria* e *Babesia*. No entanto, essas técnicas moleculares apresentam desvantagens, como o tempo de liberação do resultado e a incapacidade de diferenciar casos agudos de casos crônicos da infecção. A demora no diagnóstico pode ser um fator crítico para a abordagem clínica e terapêutica do veterinário (WANG et al., 2017).

## 2.9. Tratamento

O tratamento recomendando atualmente consiste na combinação de Atovaquona (15mg/kg VO q8h) e Azitromicina (10mg/kg VO q24h), associada à terapia suporte durante 10 dias (SCHEREEG et al. 2013; KHANA et al., 2018; WIKANDER et al., 2020; REICHARD et al. 2021; ZIEMAN et al., 2023).

As medidas de suporte devem ser aplicadas de acordo com o quadro clínico do gato. Recomenda-se, como tratamento suporte, a terapia com fluidos cristaloides intravenosos, uso de heparina para prevenir coagulação intravascular disseminada, terapia analgésica, administração de antieméticos, transfusão de hemácias, transfusão de plasma fresco ou congelado, suplementação de oxigênio, toracocentese terapêutica e suporte nutricional. Por outro lado, a terapia com antipirético ainda é contraindicada, sendo necessário mais estudos para avaliar a possível indicação desses medicamentos como parte do tratamento de suporte (REICHARD et al. 2021). A implementação precoce do tratamento adequado pode favorecer em até 60% nas chances de recuperação do paciente. Caso o animal sobreviva à fase aguda, os sinais clínicos começam a sumir entre 23 e 24 dias após a infecção, tornando-o um portador crônico do hemoparasita (WIKANDER et al., 2020).

Devido à gravidade da doença, o custo elevado do tratamento e à crescente prevalência da cytauxzoonose em algumas regiões, torna-se cada vez mais urgente o desenvolvimento de vacinas. Estudos preliminares já demonstram a produção de uma resposta imune protetora em animais inoculados com tecidos contendo esquizontes. Esses resultados sugerem que antígenos derivados de esquizontes podem ser um foco promissor para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, uma das principais dificuldades enfrentadas é o cultivo de *Cytauxzoon* spp. *in vitro*, o que representa um dos grandes desafios para a viabilização dessas vacinas (KHANA et al., 2018).

Uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacina é o uso de antígenos identificados no genoma, aliado à imunotriagem de microarray das proteínas. Essa técnica avalia mais de 650 proteínas genômicas identificadas, utilizando soros de gatos infectados e não infectados por *Cytauxzoon felis*, pois já existem alguns experimentos que revelam uma resposta imune robusta para esses antígenos. Além disso, para o desenvolvimento de vacinas eficazes, é fundamental compreender a conservação das sequências desses antígenos em isolados dos *Cytauxzoon* spp. provenientes de diferentes regiões geográficas, bem como a expressão de proteínas no estágio de esquizontes, que está associada a uma potencial resposta imune protetora (KHANA et al., 2018).

Estudos recentes têm explorado o uso de isolados e a criopreservação obtidos a partir das glândulas salivares de carrapatos em pesquisa voltadas para a produção de vacinas contra espécies de *Theileria* spp., protozoários pertencentes à mesma família do *Cytauxzoon* spp. Esses estudos incluem titulação de doses de vacinas em bovinos, a investigação da relação hospedeiro-parasito *in vitro* e a identificação de potenciais alvos terapêuticos e vacinas. O uso dessa técnica nos estudos com *Cytauxzoon* spp. tem o

potencial de amplificar significativamente os recursos disponíveis para o estudo desse agente (YANG et al., 2023).

No entanto, apesar disso tudo, a forma mais eficaz de prevenção atualmente consiste em evitar o acesso dos gatos à rua, aliado ao uso de coleiras anticarrapatos contendo imidocloprida 10%/ flumetrina 4,5%, infelizmente, essa forma de prevenção tem baixa adesão por parte dos tutores (KHANA et al., 2018).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação). Manual Pet Food Brasil. Disponível em < <https://abinpet.org.br/manual-pet-food-brasil-11-edicao/> > e acessado em 10 de dezembro de 2024.
- ANTOIGNONI, Maria Teresa; ROCCONI, Francesca; RAVAGNAN, Silvia; VASCELLARI, Marta; CAPELLI, Gioia; MIGLIO, Arianna; DI TOMMASO, Morena. ***Cytauxzoon* sp. infection and coinfections in three domestic cats in Central Italy.** Veterinary Sciences, v. 9, n. 50, 2022.
- ANDRÉ, Marcos R.; ADANIA, Cristina H.; MACHADO, Rosangela Z.; ALLEGRETIL, Silmara M.; FELIPPE, Paulo A. N.; SILVA, Ketty F.; NAKAGHI, Andréa C. H.; DAGNONE, Ana S. **Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids.** Journal of Wildlife Diseases, v.45, n. 1, p. 234-237, 2009.
- ANDRÉ, Marcos Rogério; FILGUEIRA, Kilder Dantas; CALCHI, Ana Cláudia; SOUSA, Keyla Carstens Marques de; GONÇALVES, Luiz Ricardo; MEDEIROS, Vitor Brasil; XIMENES, Poliana Araújo; LELIS, Ivana Cristina Nunes Gadelha; MEIRELES, Maria Vanuza Nunes de; MACHADO, Rosangela Zacarias. **Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats.** Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 26, n.4, p. 525-531, 2017.
- ÁNDRE, Marcos Rogério; CALCHI, Ana Cláudia; FURQUIM, Maria Eduarda Chiaradia; DE ANDRADE, Isabela; ARANTES, Paulo Vitor Cadina; LOPES, Lara Cristina de Melo; DEMARCHI, Iuri Kauan Lins de Nascimento; FIGUEIREDO, Mayra Araguaia Pereira; LIMA, Cirilo Antonio de Paula; MACHADO, Rosangela Zacarias. **Molecular detection of tick-borne agents in cats from Southeastern and Northern Brazil.** Pathogens, v. 11, p. 1-17, 2022.
- BERNÁ, Luisa; REGO, Natalia; FRANCA, Maria E. **The elusive mitochondrial genomes of Apicomplexa: Where are we now?** Frontiers in Microbiology, v. 12, p. 751-775.
- BOISARD, Julie; FLORENT, Isabelle. **Why the–omic future of *Apicomplexa* should include gregarines.** Biology of the cell, v.112, p. 173-185, 2020.
- CAEIRO, C. C.; BURROWS, A. M.; WALLER, B. M. **Development and application of CatFACS: Are human cat adopters influenced by cat facial expressions?** Applied Animal Behaviour Science, v. 189, p. 66-78, 2017.
- CHEN, M. Y. **Exploring the categories and main morphological features of cats.** International Journal of Molecular Zoology, v. 13, n. 1, 2023.
- COHN, L. A.; BIRKENHEUER, A. J.; BRUNKER, J. D.; RATCLIFF, E. R.; CRAIG, A. W. **Efficacy of Atovaquone and Azithromycin or Imidocarb Dipropionate in cats**

- with acute cytauxzoonosis.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.25, p. 55-60, 2011.
- DE MELO, Thyara Bezerra; SILVA, Tatiene Rossana Mota; DE ALMEIDA, Telga Lucena Alves Craveiro; TUTIJA, Juliane Franciele; DA SILVA, Angélica Oliveira; LIRA, Mariana da Silva; AMORIN, Débora; GIANNELLI, Alessio; RAMOS, Carlos Alberto do Nascimento; ALVES, Leucio Câmara; DE CARVALHO, Gílcia Aparecida. RAMOS, Rafael Antonio Nascimento. **Molecular detection of vector-borne pathogens in cats tested for FIV and FeLV.** Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, n. 40, 2023.
- DÍAZ-REGAÑÓN, David; VILLAESCURA, Alejandra; AYLLÓN, Tania; RODRÍGUEZ-FRANCO, Fernando; BENETH, Gad; CALLEJA-BUENO, Lydia; GARCÍA-SANCHO, Mercedes; AGULLA, Beatriz; SAINZ Ángel. **Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain.** Parasites and Vectors, v.10, p. 1-9, 2017.
- DUARTE, Matheus Almeida; OLIVEIRA, Camila Manoel de; HONORATO, Sandy Menezes; BATISTA, Liliane Maria do Rosario; MENDONÇA, Janaína Tavares; SOUZA, Davi Emanuel Ribeiro de; HIRANO, Liria Queiroz Luz; ANDRÉ, Marcos Rogério; CASTRO, Márcio Bortelho de; PALUDO, Giane Regina. ***Cytauxzoon brasiliensis* sp. Nov. (Apicomplexa: Theileriidae), a new species infecting a little-spotted-cat (*Leopardus tigrinus*) (Carnivora: Felidae) from Brazil.** Systematic Parasitology, v. 101, n. 53, 2024.
- FAGUNDES-MOREIRA, Renata; SOUZA, Ugo Araújo; MAY-JUNIOR, Joares Adenilson; BAGGIO-SOUZA, Vinícius; BERGER, Laura; WAGNER, Paulo Guilherme Carniel; MAZIM, Fabio Dias; PETERS, Felipe Bortolotto; FAVARINI, Marina Ochoa; TORTATO, Marcos Adriano; ALBANO, Ana Paula N.; FAGUNDES, Darwin Dias; HABERFELD, Mario B.; SARTORELO, Leonardo R.; RANPIM, Lilian Elaine; FRAGOSO, Carlos Eduardo; GIROTTO-SOARES, Aline; MARTINS, Thiago F.; VALLE, Stella de Faria; SOARES, João Fabio. **Epidemiological compatibility of *Amblyomma sculptum* as possible vector and *Panthera onca* as reservoir of *Cytauxzoon* spp. in midwestern Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 13, 2022.
- FURTADO, Mariana Malzoni; TANIWAKI, Sueli Akemi; METZGER, Betina; PADUAN, Karina dos Santos; O'DWYER, Helena Lucia; JÁCOMO, Anah Tereza de Almeida; PORFÍRIO, Grasiela E. O.; SILVEIRA, Leandro; SOLLMANN, Rahel; TÔRRES, Natália Mundim; NETO, José Soares Ferreira. **Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil?** Ticks and Tick-borne diseases, v. 8, p. 470-476, 2017.
- FRÉNAL, Karine; DUBREMETZ, Jean-François; LEBRUN, Maryse; SOLDATI-FAVRE, Dominique. **Gliding motility powers invasion and egress in *Apicomplexa*.** Nature Reviews Microbiology, v. 15, p. 645-660, 2017.
- GALLUSOVÁ, Martina; JIRSOVÁ, Dagmar; MIHALCA, Andrei D.; GHERMAN, Călin Mircea; D'AMICO, Gianluca; QABLAN, Moneeb A.; MODRÝ, David. ***Cytauxzoon* infections in wild felids from Carpathian-Danubian-Pontic Space:**

- Evidence for a different *Cytauxzoon* species in European Felids.** Journal of Parasitology, v102, p.377-380, 2016.
- GONÇALVES, Luiz Ricardo; PALUDO, Giane; BISOL, Talita Barcelos; PERLES, Livia; DE OLIVEIRA, Laryssa Borges; OLIVEIRA, Camila Manoel de; DA SILVA, Thiago Merighi Vieira; NANTES, Westey Arruda Gimenes; DUARTE, Matheus Almeida; SANTOS, Filipe Martins; PORFÍRIO, Grasiela Edith de Oliveira; HIRANO, Liria Queiroz Luz; HERRERA, Heitor Miraglia; BARROS-BATTESTI, Darci Moraes; MACHADO, Rosangela Zacarias; ANDRÉ, Marcos Rogério. **Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from White-eared opossum (*Didelphis albiventris*).** Parasitology Research, v.120, p. 3337-3549, 2021.
- GONÇALVES, J. A. C. N; CAPANEMA, N. P; PINHO, V. S; CASTRO, B. G; TANCREDI, I. P; RAIA, V. A. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitose em gatos domésticos (*Felis catus*) da região Amazônica Mato-Grossense.** Scientific Electronic Archives, v. 13, 2021.
- HARTLEY, Ashley N.; MARR, Henry S.; BIRKENHEUER, Adam J. ***Cytauxzoon felis* cytochrome b gene mutation associated with atovaquone and azithromycin treatment.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 34, p. 2432-2437, 2020.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Tabelas SIDRA da Pesquisa Nacional de Saúde – Domicílio com algum gato por situação do domicílio.** disponível em <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=gatos>> e acessado em 31 de março de 2022.
- JAKOB. W; WESEMEIER, H. H. **A fatal infection in Bengal Tiger resembling *Cytauxzoonosis* in domestic cats.** Journal of Comparative Pathology, v. 114, p. 439-444, 1996.
- JALOVECKA, Marie; HAJDUSEK, Ondrej; SOJKA, Daniel; KOPACEK, Petr; MALANDRIN, Laurence. **The complexity of piroplasms life cycles.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 8, article 248, 2018.
- KHANA, Daven B.; PETERSON, David S.; STANTON, James B.; SCHEREEG, Megan E. BIRKENHEUER, Adam J.; TARIGO, Jaime L. **Genetic conservation of *Cytauxzoon felis* antigens and mRNA expression. In the schizont life-stage.** Veterinary Parasitology, v. 263, p. 49-53, 2018.
- KETZ-RILEY, Cornelia J.; REICHARD, Mason V.; BUSSCHE, Ronald A. Van Den; HOOVER, John P.; MEINKOTH, James; KOCAN, A. Alan. **An Intraerythrocytic small piroplasma in wild-caught Pallas's Cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia.** Journal of Wildlife Diseases, v. 39, p. 424-430, 2003
- MAGGI, Ricardo G.; KRÄMER, Friederike. **A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America.** Parasites and Vectors, v. 12, n. 145, 2019



- MACHADO, Daiana de Souza; MACHADO, Juliana Clemente; SOUZA José Olímpio Tavares de; SANT'ANNA, Aline Cristina. **A importância da guarda responsável de gatos domésticos: aspecto práticos e conexões com o bem-estar animal.** Revista Acadêmica Ciência Animal, v.17, 2019.
- MORRISON, David A. **Evolution of the *Apicomplexa*: Where are we now?** Trends in Parasitology, v. 25, p. 375-382.
- OLIVEIRA, Camila Manoel de; YANG, Sharon; DUARTE, Matheus Almeida; FIGUEIREDO, Daniela Maciel; BATISTA, Liliane Maria do Rosario; MARR, Henry; MCMANUS, Concepta Margaret; ANDRÉ, Marcos Rogério; BIRKENHEUER, Adam Joseph; Paludo, Giane Regina. **Piroplasmid infection is not associated with clinicopathological and laboratory abnormalities in cats from Midwestern Brazil.** Parasitology Research, n.9, p. 2561-2570, 2022.
- PACHECO, Nicolas dos Santos; TOSETTI, Nicolò; KORENY, Ludek; WALLER, Ross F.; SOLDATI-FAVRE, Dominique. **Evolution, composition, assembly, and function of the conoid in *Apicomplexa*.** Trends in Parasitology, v. 36, p. 688-704, 2020.
- PANAIT, Luciana Cătălina; MIHALCA, Andrei Daniel; MODRÝ, David; JURÁNKOVÁ, Jana; IONICĂ, Angela Monica; DEAK, Georgiana; GHERMAN, Călin Mircea; HEDDERGOTT, Mike; HODŽIĆ, Adnan; VERONESI, Fabrizia; REICHARD, Mason; ZIEMAN, Elliott A.; NIELSEN, Clayton K.; JIMÉNEZ-RUIZ, Francisco Agustín; HRAZDILOVÁ, Kristýna. **Three new species of *Cytauxzoon* in European wild felids.** Veterinary Parasitology, v. 290, 2021.
- PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T. N.; BARROS, S. S. **Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 145, p. 383-387, 2007.
- RAIMUNDO, Juliana Macedo; GUIMARÃES, Andresa; ANDRÉ, Marcos Rogério; BALDANI, Cristiane Divan. ***Cytauxzoon felis* DNA detection in healthy cats from Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Parasitology, v. 107, n. 5, p. 676-678, 2021.
- REICHARD, Mason V.; SANDERS, Tiana L.; WEERARATHNE, Pabasara; MEINKOTH, James H.; MILLER, Craig A.; SCIMECA, Ruth C.; ALMAZÁN, Consuelo. **Cytauxzoonosis in North America.** Pathogens, v. 10, 2021.
- SCHEREEG, Megan E.; MARR, Henry S.; TARIGO, Jaime L.; COHN, Leah A.; BIRD, David M.; SCHOLL, Elizabeth H.; LEVY, Michael G.; WIEGMANN, Brian M.; BIRKENHEUER, Adam J. **Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of *Piroplasmida* phylogeny.** Plos One v. 11, 2016.
- SCHEREEG, Megan E.; MARR, Henry S.; TARIGO, Jaime; COHN, Leah A.; LEVY, Michael G.; BIRKENHEUER, Adam J. **Pharmacogenomics of *Cytauxzoon felis* Cytochrome b: implications for Atovaquone and Azithromycin therapy in domestic cat with cytauxzoonosis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 51, n. 9, p. 3.066-3.069, 2013.

- SCHNITTGER, Leonhard; GANZINELLI, Sabrina; BHOORA, Raksha; OMONDI, David; NIJHOF, Ard M.; FLORIN-CHRISTENSEN, Mónica. **The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights**. Parasitology Research, v. 121, p. 1207-1245, 2022.
- Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Distrito Federal (SEMA-DF). **Pesquisa populacional de cães e gatos no DF**. disponível em <<https://www.sema.df.gov.br/pesquisa-populacional-de-caes-e-gatos-do-df/>> e acessado em 01 de novembro de 2024.
- SILVA, P. M. P.; REZENDE, A. S.; OLIVEIRA, G. G.; GODOY, K. C. S.; ANTUNES, T. R.; SILVA, M. C. C.; AZUAGA, L. B. S.; RAMOS, C. A. N.; SOUZA, A; I. **Desordens hematológicas em onças-pardas (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) infectadas por *Cytauxzoon felis***. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 72, n. 4, p. 1258-1262, 2020.
- SLEZNIKOW, Casey R.; GRANICK, Leah A.; NAFE, Laura A.; RENDAHL, Aaron; BURTON, Erin N. **Evaluation of various sample sources for the cytologic diagnosis of *Cytauxzoon felis***. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 36, p. 126-132, 2022.
- VERBRUGGHE, Adronie; HESTA, Myriam. **Cats and carbohydrates: The carnivore fantasy?** Veterinary Sciences, v. 4, n. 55, 2017.
- WANG, Jin-Lei; LI, Ting-Ting; LIU, Gou-Hua; ZHU, Xing-Quan; YAO<sup>b</sup>, Chaoqun. **Two tales of *Cytauxzoon felis* infections in domestic cats**. Clinical Microbiology Reviews, v. 30, 2017.
- WIKANDER, Yvonne M.; KANG, Qing; REIF, Kathryn. **Acute *Cytauxzoon felis* case in domestic cats from Eastern Kansas, a retrospective case-control study (2006-2019)**. Veterinary Sciences, v. 7, n. 205, 2020.
- WIKANDER, Yvonne M.; REIF, Kathryn E. ***Cytauxzoon felis*: Overview**. Pathogens, v.12, n.133, 2023.
- YANG, Tzushan S.; REICHARD, Mason V.; THOMAS, Jennifer E.; MARR, Henry S.; KAROUNOS, Michael; HYATT, Julia; MILLER, Craig; BIRKENHEUER, Adam J. **Transmission of *Cytauxzoon felis* by injection of *Amblyomma americanum* salivary glands**. Parasitology International, v. 95, 2023.
- ZIEMAN, Elliott A.; JIMÉNEZ, F. Agustín; NIELSEN, Clayton K. **Concurrent examination of bobcats and ticks reveals high prevalence of *Cytauxzoon felis* in Southern Illinois**. Journal of Parasitology, v. 103, p. 343-348, 2017.
- ZIEMAN, Elliott A.; LAWSON, Trevor; NIELSEN, Clayton K.; JIMÉNEZ, F. Agustín. **Within-season changes in *Cytauxzoon felis* parasitemia in bobcats**. Journal of Parasitology, v. 106, n.2, p. 308-311, 2020.
- ZIEMAN, Elliott A.; PHILLIPS, Victoria C.; JIMÉNEZ, F. Agustín; Clayton K.; JIMÉNEZ. **Clinical and subclinical *Cytauxzoon felis* infections in domestic cats**

**from a recently identified endemic region.** Journal of Parasitology, v.109, n.5, p.525-529, 2023.

ZOU, Feng-Cai; LI, Zhao; YANG, Jian-Fa; CHANG, Jiang-Yan; LIU, Guo-Hua; LV, Yan; ZHU, Xing-Quan. ***Cytauxzoon felis* infection in domestic cats, Yunnan Province, China, 2016.** Emerging Infectious Diseases, v. 25, n. 2, 2019.

## **CAPÍTULO 2**

### ***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

## 1. RESUMO

### ***Cytauxzoon brasiliensis* EM GATOS DOMÉSTICOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

Liliane Maria do Rosario Batista<sup>1</sup>, Giane Regina Paludo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

<sup>2</sup> Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

*Cytauxzoon spp.* (*Apicomplexa: Piroplasmida*) é um protozoário transmitido pela picada do carrapato durante o repasto alimentar, infectando felinos domésticos e silvestres em todo o mundo. Possui um ciclo de biológico complexo, sendo dividido em duas fases nos felinos: fase tecidual, associada aos quadros mais graves da cytauxzoonose, e que pode levar ao óbito do animal; e a fase eritrocitárias, associada aos quadros crônicos da infecção. No Brasil, infecções por *Cytauxzoon spp.* ocorrem em felinos silvestres e domésticos, com a maioria dos estudos demonstrando maiores ocorrências em felinos silvestres. Este trabalho teve como objetivo identificar a espécie de *Cytauxzoon* infectante em felinos domésticos no Distrito Federal, correlacionando-a com as alterações hematológicas e coinfeções. Foram analisadas 68 amostras de animais anêmicos e 11 amostras do banco de DNA do laboratório. As amostras foram submetidas a hemograma e PCR para os genes 18S rDNA e Cytb. As amostras dos animais anêmicos positivos para o gene 18S rDNA dos piroplasmídeos foram submetidas à PCR para hemoplasma, FIV e FeLV. Dez amostras positivas nas PCRs foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, demonstrando que os animais estavam infectados pelas espécies *Cytauxzoon brasiliensis* e *Babesia vogeli*. Foi observado que, dos 24 animais anêmicos positivos para infecção por *Cytauxzoon spp.*, 58,33% (14/24) apresentavam coinfeções, sendo 33,33% (8/24) por hemoplasmas, 41,67% (10/24) por FeLV e 8,33% (2/24) por FIV. A avaliação hematológica foi diferente ( $P < 0,05$ ) apenas nos animais com coinfeção por dois ou mais patógenos. Não foram observadas alterações hematológicas nas amostras do grupo do Banco de DNA, e identificação da infecção foi um achado laboratorial. O *Cytauxzoon brasiliensis* é a espécie infectante dos gatos domésticos no Distrito Federal, causando poucas alterações hematológicas.

**Palavras chaves:** Cytauxzoonose, felinos domésticos, anemia, diagnóstico, PCR

## 2. ABSTRACT

### Cytauxzoon brasiliensis IN DOMESTIC CATS FROM FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

*Cytauxzoon* spp. (*Apicomplexa: Piroplasmida*) é um protozoário transmitido por meio da picada de carrapatos durante o repasto sanguíneo, infectando felídeos domésticos e selvagens em todo o mundo. Possui um ciclo biológico complexo, dividido em duas fases nos felídeos: a fase tecidual, associada aos casos mais graves de citauxzoonose, podendo levar ao óbito do animal; e a fase eritrocítica, relacionada a casos crônicos da infecção. No Brasil, infecções por *Cytauxzoon* spp. ocorrem em felídeos selvagens e domésticos, sendo que a maioria dos estudos demonstra maior ocorrência em felídeos selvagens. O presente estudo teve como objetivo identificar a espécie de *Cytauxzoon* infectando felídeos domésticos no Distrito Federal, correlacionando-a com alterações hematológicas e coinfeções. Foram analisadas 68 amostras de animais anêmicos e 11 amostras provenientes do banco de DNA do laboratório. As amostras foram submetidas à avaliação hemograma completa e à PCR para os genes 18S rDNA e Cytb. Amostras de animais anêmicos positivas para o gene 18S rDNA de piroplasmídeos foram também submetidas à PCR para hemoplasmas, FIV e FeLV. Dez amostras positivas nas PCRs foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, demonstrando que os animais estavam infectados pelas espécies *Cytauxzoon brasiliensis* e *Babesia vogeli*. Observou-se que, dentre os 24 animais anêmicos positivos para infecção por *Cytauxzoon* spp., 58,33% (14/24) apresentavam coinfeções, sendo 33,33% (8/24) por hemoplasmas, 41,67% (10/24) por FeLV e 8,33% (2/24) por FIV. A avaliação hematológica apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) apenas em animais com coinfeção por dois ou mais patógenos. Não foram observadas alterações hematológicas nas amostras provenientes do grupo do banco de DNA, sendo a identificação da infecção um achado laboratorial. Conclui-se que *Cytauxzoon brasiliensis* é a espécie que infecta gatos domésticos no Distrito Federal, causando poucas alterações hematológicas.

**Key Words:** Cytauxzoonosis, domestic felines, anemia, diagnosis, PCR

### 3. INTRODUÇÃO

*Cytauxzoon* spp. (*Apicomplexa: Piroplasmida*) é um hemoparasita transmitido por um vetor hematófago e pode infectar felinos silvestres e domésticos (WANG et al., 2017; PANAIT et al., 2021; WIKANDER & REIF, 2023; DUARTE et al., 2024). Possui um ciclo biológico complexo e ainda não completamente elucidado. Contudo, sabe-se que apresenta, no vetor, reprodução sexuada e assexuada, resultando no desenvolvimento da forma infectante (esporozoíto), que será transmitida ao hospedeiro felino durante o repasto do vetor. Por outro lado, no hospedeiro vertebrado, o parasito possui reprodução assexuada, apresentando duas fases: uma chamada de eritrocitária, com os merozoítos infectando as hemácias, e a outra denominada de fase tecidual, quando os esquizontes são encontrados nas células fagocíticas mononucleares (monócitos e macrófagos) (ANDRÉ et al. 2009; WANG et al., 2017; KHANA et al., 2018; ZOU et al, 2019; WIKANDER et al., 2020; RAIMUNDO et al., 2021).

Desde o primeiro relato de infecção por *Cytauxzoon felis* em um gato doméstico, em 1976, nos Estados Unidos, causando um quadro grave e letal, inúmeros outros relatos surgiram nas Américas, Ásia, África e Europa. Por mais de uma década, as espécies e nomenclatura desse gênero têm sido motivos de debates devido às características morfológicas indistinguíveis dos merozoítas (JAKOB & WESEMEIER, 1996; SCHEREEG et al., 2016; WANG et al., 2017; KHANA et al., 2018; PANAIT et al., 2021; ANTOGNONI et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Como resultado, novas espécies foram sendo identificadas. Até o momento, já foram identificadas seis espécies de *Cytauxzoon* infectando gatos domésticos e silvestres: *C. felis* na América do Norte; *C. manul* na Ásia; *C. europaeus*, *C. otrantorum* e *C. banethi* na Europa; e *C. brasiliensis* no Brasil (WANG et al., 2017; PANAIT et al., 2021; WIKANDER & REIF, 2023; DUARTE et al., 2024).

Os carrapatos *Dermacentor variabilis* (carrapato-americano-do-cão) e o *Amblyomma americanum* (carrapato-estrela-solitária) foram identificados nos Estados Unidos como os vetores responsáveis por transmitir *Cytauxzoon felis* aos felinos. Nas demais regiões do mundo, entretanto, as espécies envolvidas na transmissão do *Cytauxzoon* spp. ainda permanecem desconhecidas (WANG et al., 2017; ZIEMAN et al, 2017; KHANA et al., 2018; WIKANDER et al., 2020; ZIEMAN et al., 2020; ZIEMAN et al., 2023).

A cytauxzoonose é uma síndrome grave causada pela infecção por *Cytauxzoon* spp., ocorrendo quando os felinos apresentam a fase tecidual do parasito. Por muito tempo, essa fase foi relatada como fatal em gatos domésticos nos EUA, enquanto se acreditava que, nos felinos silvestres, a doença ocorria de forma mais branda, sendo esses animais apenas reservatórios do parasito. Com o passar do tempo, foi observado que quadros graves e fatais também ocorriam em felinos silvestres, assim como gatos domésticos apresentavam formas brandas da doença e até mesmo casos assintomáticas (FURTADO et al., 2017; WANG et al., 2017; ZIEMAN et al, 2017; ZOU et al, 2019; WIKANDER et al., 2020; YANG et al., 2023).

Este estudo teve como objetivos identificar, por meio de técnicas moleculares, a espécie de *Cytauxzoon* presente nas infecções dos gatos domésticos no Distrito Federal, correlacionar essa infecção com possíveis coinfeções e analisar suas alterações hematológicas.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras**

Durante o período de janeiro de 2022 a abril de 2024 foram analisadas em um laboratório particular (Laboratório One Health Veterinary - OHV) 290 amostras de sangue de pacientes felinos coletadas em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Dessas amostras, foram analisados os parâmetros hematológicos e escolhidas, aleatoriamente, 68 amostras de gatos anêmicos para compor o primeiro grupo de amostras destinadas à realização dos testes moleculares. Os gatos foram considerados anêmicos quando apresentavam os valores de hematócrito  $< 24\%$ , hemácias  $< 5,0 \times 10^6/\mu\text{l}$  e/ou hemoglobina  $< 8 \text{ g/dl}$ , segundo os valores de referência descritos por Jain (1993). Todas essas amostras foram congeladas para posterior realização das extrações do DNA.

O segundo grupo de amostras foi obtido do banco de DNA do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Biologia Molecular, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Esse grupo consistia em 11 amostras de DNA de felinos que, no ano de 2018, haviam sido testadas como positivas para piroplasmídeos em reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **4.2. Exames Hematológicos**

Os hemogramas foram realizados em um contator automático de células de uso veterinário (modelo BC-2800Vet, Mindray) utilizando reagentes próprios da marca. Desse equipamento foram obtidos os valores do número de hemácias, de leucócitos, de plaquetas, do hematócrito, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Foi realizada a técnica de micro-hematócrito para a obtenção do volume globular (VG) e assim, comparar o valor obtido com o hematócrito do equipamento. As proteínas totais plasmáticas (PPT) foram determinadas pelo uso de refratômetro portátil (modelo: SZJ-D). Foram confeccionadas lâminas pela técnica de esfregaço sanguíneo, coradas por panóptico rápido (Instant-Prov NEWPROV®) para realizar a contagem diferencial, verificar a morfologia das células sanguíneas, conferir a quantidade de plaquetas, pesquisar a presença de hemoparasitas e possíveis inclusões.

### 4.3. Ensaios Moleculares

#### 4.3.1. Extração

As extrações de DNA das amostras foram realizadas utilizando o PureLink™ Kit de Purificação de DNA genômico (Invitrogen®) seguindo todas as recomendações do fabricante. As amostras de DNA (200µl) foram armazenadas a -20°C para posterior realização das reações da polimerase em cadeia (PCR).

#### 4.3.2. PCR do Gene GAPDH

Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à PCR para a expressão do gene GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase), com o objetivo de avaliar a qualidade da extração, a integridade do DNA extraído e a presença de inibidores de PCR que poderiam acarretar resultados falso-negativos nas demais reações. Para a mistura da reação, foram utilizados 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos (**Tabela 1**), 1X de tampão (Ludwig®), 3 mM  $MgCl_2$  (Ludwig®), 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dNTP) (Ludwig®), 1,25 U de Taq polimerase (Ludwig®), 10 ng do DNA extraído e, para completar o volume de 25 µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, com 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e a extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controle negativo, foi utilizada água Milli-Q® no lugar da amostra de DNA. O produto da reação apresentava o tamanho de aproximadamente 400 pb.

#### 4.3.3. PCR para Piroplasmídeos

Inicialmente, foram realizadas PCRs de triagem para piroplasmídeos utilizando os oligonucleotídeos BabPiro (OLMEDA et al., 1997), que amplificam um fragmento curto do gene 18S rDNA (**Tabela 1**). Para as reações, foram utilizados 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 1X tampão (Invitrogen®), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP (Ludwig®), 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen®), 10 ng do DNA extraído e, para completar o volume de 25 µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, com 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e a extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de amostra de cão positiva para *Babesia* spp., observada na pesquisa realizada no esfregaço sanguíneo, e, como controle negativo, foi utilizada água Milli-Q®.

Nas amostras positivas dessa triagem, foram realizadas PCRs para os genes 18S rDNA e Cytb mitocondrial (**Tabela 1**), cujos produtos possuem tamanho de 1.335 e 1.333 pares de bases, respectivamente. As PCRs para esses genes foram do tipo *nested*. Como controle positivo, as PCRs do gene 18S rDNA utilizaram DNA de cão positivo para *Babesia* spp. em esfregaço sanguíneo. Nas reações para o gene Cytb foram utilizadas amostras de DNA de um gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) positivo para *Cytauxzoon brasiliensis* (PP583821 e PP588457). Como controle negativo para essas reações, foi utilizada água Milli-Q®.

#### 4.3.4. Análise das Coinfecções

Todas as amostras positivas nas PCRs do gene 18S de piroplasmídeos, provenientes do grupo de animais anêmicos do laboratório particular, foram testadas por meio de PCR para FIV, FeLV e hemoplasmas, com o objetivo de avaliar possíveis coinfecções por esses agentes infecciosos.

##### 4.3.4.1. PCR para FeLV

As reações para FeLV utilizaram 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos (**Tabela 1**), 1X tampão (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP, 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen®), 10 ng do DNA extraído e, para completar o volume de 25 µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, com 11 ciclos de 94°C por 1 minuto, 64°C (-1°C por ciclo) por 1 minuto e 72°C por 90 segundos, e com 23 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto dessa reação apresentou tamanho de 927 pb. Como controle positivo, foi utilizado sangue de um felino com diagnóstico molecular prévio de FeLV, e, como controle negativo, foi utilizada água Milli-Q®.

##### 4.3.4.2. PCR para FIV

A *nested* PCR para FIV utilizou os oligonucleotídeos apresentados na **Tabela 1**. Para a primeira reação, preparou-se uma mistura contendo 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 1X tampão (Invitrogen®), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP, 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen®), 10 ng do DNA extraído e, para completar o volume de 25 µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador consistiam em desnaturação inicial a 96°C por 4 minutos, com 12 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C (-0,5°C por ciclos) durante 1 minuto e extensão a 72°C por 90 segundos, e 28 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 46°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 90 segundos, a extensão final a 72°C por 5

minutos. O controle positivo da reação foi uma amostra previamente positiva para FIV em PCR, e a água Milli-Q® foi utilizada como controle negativo. O produto dessa reação apresentou o tamanho de 684pb.

A segunda reação utilizou uma mistura contendo 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos (**Tabela 1**), 1X tampão (Invitrogen®), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP, 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen®), foi utilizado 10 ng da reação do primeiro *round* como amostra e, para completar o volume de 25 µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 96°C por 4 minutos, com 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 90 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O fragmento produzido na PCR do segundo *round* apresentou o tamanho de aproximadamente 329 pb.

#### 4.3.4.3. PCR para Hemoplasma

Para testar as amostras para hemoplasmas, foi feito uma reação com 25 pmol de cada um dos oligonucleotídeos (**Tabela 1**), 1X tampão (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP, 1,25 U Taq polimerase (Invitrogen®), 10 ng do DNA extraído e, para completar o volume de 25µL da reação, foi utilizada água Milli-Q®. As condições do termociclador utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e a extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle positivo da reação foi uma amostra de felino previamente diagnosticado molecularmente para hemoplasma, e o controle negativo foi a água Milli-Q®. O produto dessa reação apresentou tamanho de aproximadamente 595 pb.

#### 4.3.5. Eletroforese

Os produtos de cada uma das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose impregnado com brometo de etídio para visualização no transluminador de fluorescência (*UV Transilluminator UVP®*). Os produtos das reações de GAPDH, FIV, FeLV e *Mycoplasma* spp. foram corridos em gel de agarose a 2%, utilizando marcador molecular (Ludwig®) com intervalo de 100 pb. Os produtos das reações dos genes 18S rDNA e Cytb foram corridos em gel de agarose a 1%, utilizando marcador molecular com intervalo de 1 Kb (Ludwig®) para determinar o tamanho do produto amplificado.

**Tabela 1:** Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

| Oligonucleotídeos | Sequência (5'-3')                         | Agentes Identificados | Tamanho | Fontes                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------|-----------------------|---------|--------------------------------------------------------------|
| <b>GAPDHR</b>     | CCA AAG TTG TCA TGG AGT ACC               | GAPDH<br>Mamíferos    | 400pb   | BIRKENHEUE<br>R et. al., 2003                                |
| <b>GAPDHF</b>     | CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T             |                       |         |                                                              |
| <b>HBT-F</b>      | ATA CGG CCC ATA TTC CTA CG                | 16S<br>Hemoplasma     | 595pb   | CRIADOFORN<br>ELIO et. al.,<br>2003                          |
| <b>HBT-R</b>      | TGC TCC ACC ACT TGT TGA                   |                       |         |                                                              |
| <b>PIRO A</b>     | AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G             | 18S<br>Piropasmídeos  | 400pb   | OLMEDA et.<br>al. 1997                                       |
| <b>PIRO B</b>     | TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC               |                       |         |                                                              |
| <b>A2</b>         | AAT ATG ACT GTA TCT ACT GC                | Gag FIV               | 684pb   | HOHDATSU et.<br>al., 1998                                    |
| <b>S2</b>         | TTT TCT TCT AGA GTA CTT TCT GG            |                       |         |                                                              |
| <b>NS</b>         | TAT TCA AAC AGT AAA TGG AG                | Gag FIV               | 329pb   | HOHDATSU et.<br>al., 1998                                    |
| <b>NA</b>         | CTG CTT GTT GTT CTT GAG TT                |                       |         |                                                              |
| <b>PCR-S</b>      | AGC TAC TGC AGT GGT GYC ATT TC            | LTR (U3) /Gag<br>FeLV | 927pn   | TZAVARAS et.<br>al., 1990;<br>MIYAZAWA &<br>JARRETT,<br>1997 |
| <b>GR1</b>        | GAC CAG TGA TCA AGG GTG AG                |                       |         |                                                              |
| <b>CY7548R</b>    | GAC TGA ATT CGA CTT CTC CTT CCT<br>TTA AG | 18S<br>Piropasmídeos  | 1.726pb | PANAIT et. al.,<br>2021                                      |
| <b>CY7549F</b>    | GTC AGG ATC CTG GGT TGA TCC TGC<br>CAG    |                       |         |                                                              |
| <b>CYSSUF2</b>    | CAT GGA TAA CCG TGC TAA TTG               | 18S<br>Piropasmídeos  | 1.335pb | PANAIT et. al.,<br>2021                                      |
| <b>CYSSUR4</b>    | AGG ATG AAC TCG ATG AAT GCA               |                       |         |                                                              |
| <b>CYTBF1</b>     | CTT AAC CCA ACT CAC GTA CC                | Cytb<br>Piropasmídeos | 1.434pb | PANAIT et. al.,<br>2021                                      |
| <b>CYTBR3</b>     | GGT TAA TCT TTC CTA TTC CTT ACG           |                       |         |                                                              |
| <b>CYCYFinn</b>   | ACC TAC TAA ACC TTA TTC AAG CRT<br>T      | Cytb<br>Piropasmídeos | 1.333pb | PANAIT et. al.,<br>2021                                      |
| <b>CYCYRinn</b>   | AGA CTC TTA GAT GYA AAC TTC CC            |                       |         |                                                              |

**Onde:** GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase; Cytb, Citocromo b; Gag, Antígeno de grupo específico; FIV, Vírus da imunodeficiência felina; LRT, Repetições terminais longas, FeLV, Vírus da Leucemia Felina.

#### 4.3.6. Sequenciamento e Análise Filogenética

Foi realizado o sequenciamento de 10 amostras positivas para o gene 18S rDNA, selecionadas com base na presença de bandas fortes e do tamanho esperado para o agente no gel de agarose (**Figura 1**). Além disso, foi sequenciada uma amostra positiva para o gene Cytb. Para o sequenciamento genético, foram realizadas novas reações utilizando os produtos das reações do primeiro *round* das amostras selecionadas. As misturas foram preparadas para um volume final de 50 µL. Em seguida, os produtos das novas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com posterior visualização no transiluminador, para verificar se as PCRs funcionaram adequadamente. As reações que apresentaram produtos de tamanho adequado foram purificadas usando kit comercial (*PuriLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* da marca Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas no equipamento *NanoVue Plus® Spectrophotometer* (General Electric-GE) e, apenas as amostras com concentração de DNA acima de 45ng/µl e pureza de A260/A280 acima de 1.700 foram enviadas para o sequenciamento de DNA. As amostras foram sequenciadas pelo método de SANGER no Centro de Recursos

Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal (FCAV).

Utilizou-se o software de bioinformática Geneious Prime para analisar e organizar as informações obtidas no sequenciamento das amostras. O fragmento obtido de cada amostra foi comparado no GenBank® para identificação do parasito.

Foi realizada a confecção de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança baseadas no 18S rRNA. Foi incluído um alinhamento de 126 sequências (1.070 pb), cobrindo todas as espécies do gênero com sequências disponíveis no banco de dados do GenBank® e que possuíam fragmentos maiores que 1.070 pb. O alinhamento foi realizado por meio do algoritmo ClustalW, e a construção da árvore foi feita pelo software RaX-ML-NGv1.2.1, enraizadas com *Hepatozoon* spp. (MH615006) como ramo externo. Utilizou-se a ferramenta jModelTest v2.1.10 para estimar o melhor modelo de substituição (HKY+G+I). Foi feita análise Bootstrap com pelo menos 1.000 réplicas, e a convergência foi avaliada.

#### 4.4. Análises Estatísticas

Foram aplicados testes estatísticos para avaliar possíveis diferenças nos resultados hematológicos dos animais do grupo de paciente anêmicos. Para essa avaliação, os resultados hematológicos de cada animal foram organizados em grupos: animais positivos para o gene 18S rDNA e animais negativos; animais sem coinfeção e com coinfeção; animais sem coinfeção e os com coinfeções foram agrupados pelos tipos de coinfeção.

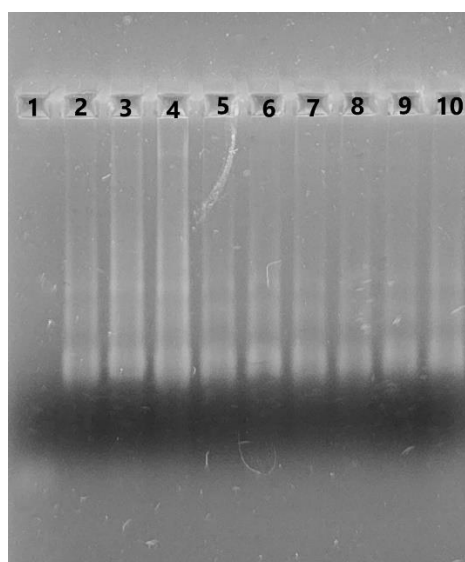
A análise estatística dos dados foram realizadas no SAS® OnDemand for Academics (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC). Foram calculadas a média e o desvio padrão dos parâmetros em cada grupo avaliado. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se a distribuição dos dados de cada variável seguia a normalidade, a fim de determinar a aplicação de testes paramétricos ou não paramétricos para avaliar a existência de diferenças significativas entre as variáveis analisadas em cada grupo.

O teste paramétrico realizado foi o General Linear Model (GLM), enquanto o teste não paramétrico aplicado foi o Wilcoxon Rank-Sum. Esses testes estatísticos foram utilizados para comparar os grupos: animais positivos para o gene 18S rDNA com os animais negativos e animais sem coinfeção com aqueles que apresentam coinfeção. Para a avaliação do grupo de animais sem coinfeção comparado com cada tipo de coinfeção, foi realizado o teste ANOVA de uma via (One-way ANOVA) como teste paramétrico e o teste de Kruskal-Wallis, associado a um pós-teste de Dunn, como teste não paramétrico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise do Gene GAPDH

A PCR realizada para o gene GAPDH nas 79 amostras extraídas apresentou resultados positivos (**Figura 1**). Esses resultados indicam que o DNA extraído das amostras possui alta qualidade, demonstrando, também, a ausência de inibidores das reações de PCR. Esse gene é amplamente utilizado como controle interno nos estudos com PCR, sendo essencial para validar a qualidade e a integridade do DNA nas análises moleculares (REBOUÇAS et al, 2013). A detecção bem-sucedida em todas as amostras assegura a confiabilidade do protocolo de extração empregado e a eficiência do método de amplificação utilizado. Com base nesses resultados, concluiu-se que as amostras estavam aptas para serem utilizadas nas análises posteriores.

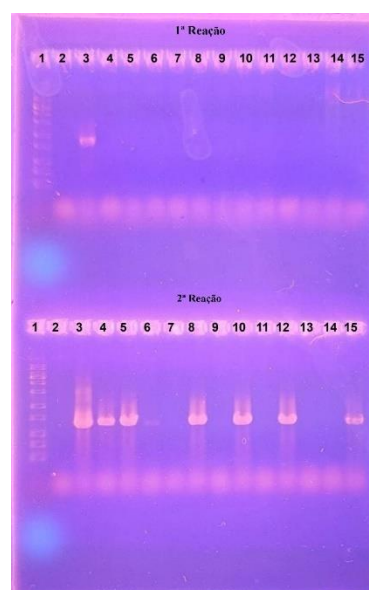


**Figura 1:** Resultado da PCR para o gene GAPDH. **Legenda:** 1- Controle Negativo; 2 ao 10 - Amostras extraídas.

### 5.2. Análise das Infecções por Piroplasmídeos

No presente estudo, realizou-se a análise molecular por meio de PCR convencional de amostras de felinos domésticos, utilizando conjuntos de oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos de DNA de aproximadamente 1.335 pb para o gene 18S rDNA (**Figura 2**) e fragmentos de aproximadamente 1.333 pb para o gene Cytb dos piroplasmídeos (PANAIT et al., 2021; DUARTE et al., 2024). Como resultado desses ensaios, demonstrou-se que 35,29% dos felinos anêmicos analisados no

laboratório foram positivos para o gene 18S rDNA dos piroplasmídeos, e 72,73% das amostras do banco de DNA foram positivas para esse gene (**Tabela 2**). A infecção por *Cytauxzoon* spp. já foi relatada em diversas regiões, como África, Ásia, Europa, Estados Unidos e no Brasil (KHANA et al., 2018; ZOU et al., 2019; FAGUNDES-MOREIRA, 2022; OLIVEIRA et al., 2022; ZIEMAN et al., 2023). No Brasil, existem poucos estudos sobre *Cytauxzoon* spp. e, em sua maioria, descrevem casos de infecção em felinos silvestres (FURTADO et al., 2017; SILVA et al., 2020; RAIMUNDO et al., 2021). Nos gatos domésticos, já foram relatados casos de infecções por esse hemoprotozoário nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rondônia, Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco e no Distrito Federal (OLIVEIRA et al., 2022; DE MELO et al., 2023).



**Figura 2:** Resultado da PCR para o gene 18S de piroplasmídeos utilizando os oligonucleotídeos CY7548R, CY7549F, CYSSUR4 e CYSSUF2.  
**Legenda:** 1- marcador de peso molecular (1 kb, Ludwig®); 2- Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4, 5, 6, 8, 10, 12 e 15 – Pacientes Positivos; 7, 9, 11, 13 e 14 – Pacientes Negativos.

**Tabela 2:** Número total e porcentagem de animais positivos e negativos em cada PCR realizadas com os animais dos grupos do Banco de DNA e Animais Anêmicos.

| Ensaio molecular         | Banco de DNA |             | Animais Anêmicos |             |
|--------------------------|--------------|-------------|------------------|-------------|
|                          | Positivos    | Negativos   | Positivos        | Negativos   |
| PCR para o Gene 18S rDNA | 8 (72,73%)   | 3 (27,27%)  | 24 (35,29%)      | 44 (64,71%) |
| PCR para o Gene Cytb     | 0            | 11 (100%)   | 1 (4,17%)        | 23 (95,83%) |
| PCR para Hemoplasma      | 0            | 8 (100%)    | 8 (33,33%)       | 16 (66,67%) |
| PCR para FIV             | Não testado  | Não testado | 2 (8,33%)        | 22 (91,67%) |
| PCR para FeLV            | Não testado  | Não testado | 10 (41,67%)      | 14 (58,33%) |

**Onde:** PCR, Reação em cadeia da polimerase; Cytb, Citocromo b; FIV, Vírus da imunodeficiência felina; FeLV, Vírus da Leucemia Felina.



A alta ocorrência de infecção por *Cytauxzoon* observada nos ensaios moleculares do presente estudo pode ter sido influenciada pelo tipo de população escolhida para a análise. Com base nos dados obtidos a partir da população de gatos domésticos do grupo dos anêmicos, é possível que os resultados reflitam uma alta prevalência de gatos anêmicos infectados por *Cytauxzoon* spp. Portanto, é necessário aumentar o número de amostras de animais anêmicos testados para confirmar se esses dados se mantêm consistentes. Embora a alta ocorrência tenha sido observada no grupo das amostras do Banco de DNA do laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), esses números estão sujeitos a viés, uma vez que foram selecionadas apenas amostras previamente diagnosticadas molecularmente para piroplasmídeos. Dessa forma, não é possível afirmar com precisão se essa população de gato apresentavam, de fato, uma alta ocorrência de infecção por *Cytauxzoon* spp. Em um estudo conduzido com gatos domésticos do Centro-Oeste do Brasil, foi relatada uma prevalência moderada de infecção por *Cytauxzoon* spp. (7,2%; 12/166). Outro estudo, que avaliou 390 amostras de gatos domésticos provenientes de três estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo e Rondônia), identificou que 27,2% das amostras foram positivas para *Cytauxzoon* spp., com prevalência de 41,9% (65/155) em Minas Gerais, 24,5% (37/151) em São Paulo e 4,8% (4/84) em Rondônia. Em contrapartida, um levantamento conduzido com 151 gatos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, revelou apenas um animal positivo para *Cytauxzoon* spp. De forma semelhante, um estudo realizado em 2021 com 197 gatos saudáveis atendidos em clínicas veterinárias no Rio de Janeiro detectou um único paciente positivo (0,51%) para *Cytauxzoon* spp. (ANDRÉ et al., 2015; RAIMUNDO et al., 2021; ANDRÉ et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022).

Das dez amostras sequenciadas para o gene 18S rDNA, as análises moleculares e filogenéticas dos fragmentos de DNA obtidos demonstraram que nove estavam infectadas por *Cytauxzoon brasiliensis* e um por *Babesia vogeli* (**Tabela 3**). Entre essas amostras sequenciadas, quatro eram amostras provenientes do grupo de animais anêmicos do laboratório particular, sendo todas identificadas como *Cytauxzoon brasiliensis*. As demais amostras pertenciam ao grupo do banco de DNA do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UnB.

Infecções por *Babesia vogeli* também foram descritas em gatos domésticos em dois outros estudos (ANDRÉ et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Os achados desses autores, juntamente com os encontrados no presente estudo, sugerem que a população de felinos domésticos no Distrito Federal está exposta a infecções por piroplasmídeos das espécies de *Cytauxzoon* e *Babesia*. Devido a isso, torna-se necessário a correta identificação molecular dessas espécies para obtenção do diagnóstico e, desse modo, possibilitar que os médicos veterinários apliquem o tratamento adequado a esses animais quando necessário.

**Tabela 3:** Resultados das identidades de alinhamento das amostras sequenciadas positivas para piroplasmídeos e comparadas com outras amostras depositadas no GenBank.

| Amostra | Tamanho  | Gene     | Melhor hit Blastn                                             |
|---------|----------|----------|---------------------------------------------------------------|
| 1       | 1.125 bp | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-99.64% / C-100%) |
| 2       | 1.194pb  | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-100% / C-100%)   |
| 3       | 738pb    | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-99.86% / C-100%) |
| 4       | 1.219pb  | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-99.84% / C-100%) |
| 5       | 1.159pb  | 18S rDNA | <i>Babesia canis vogeli</i> - AY371195.1 (I -99.83% / C-100%) |
| 6       | 661pb    | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-99.85% / C-100%) |
| 7       | 1.220pb  | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-99.92% / C-100%) |
| 8       | 898pb    | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-100% / C-100%)   |
| 8       | 868pb    | Cytb     | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP588457 (I-100% / C-100%)   |
| 9       | 1.089pb  | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-100% / C-100%)   |
| 10      | 748pb    | 18S rDNA | <i>Cytauxzoon brasiliensis</i> - PP583821 (I-100% / C-100%)   |

Onde: pb, pares de base; rDNA, Ácido desoxirribonucleico ribossomal; Cytb, Citocromo b.

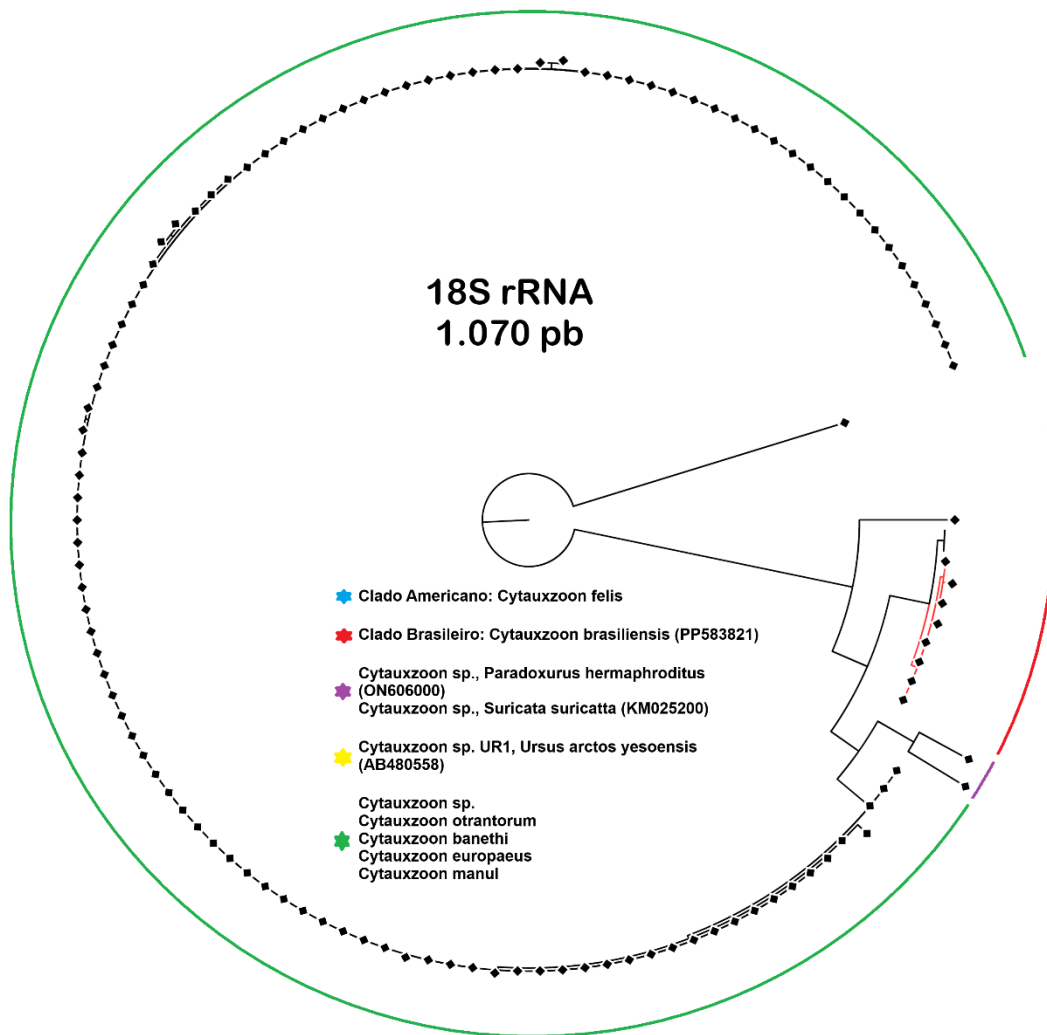
Das amostras identificadas como *Cytauxzoon brasiliensis*, cinco apresentavam fragmentos de DNA acima de 1.000 pb, enquanto as demais apresentaram fragmentos menores, sendo o menor com tamanho de 661 pb (**Tabela 3**). Todos os fragmentos obtidos apresentaram cobertura de 100% do alinhamento e identidades entre 99,64% e 100% com o *Cytauxzoon brasiliensis* identificado por Duarte et. al. (2024). O único paciente que teve tanto o gene 18S rDNA quanto o gene Cytb sequenciado, apresentou tamanhos de fragmentos de 898 pb e 868 pb, respectivamente. Embora os fragmentos tenham sido pequenos, quando foi realizado o alinhamento com outras sequências depositadas no GenBank, foi observado que, com base nesses dois genes, o agente identificado apresentava 100% similaridade genética com a espécie *C. brasiliensis*.

*Cytauxzoon brasiliensis* foi descrito e identificado pela primeira vez infectando um gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) em Brasília, Brasil. Análises moleculares e filogenéticas, baseadas nos genes 18S rDNA e Cytb, demonstraram diferenças significativas entre essa nova espécie e aquelas previamente detectadas na Ásia, América do Norte e Europa (DUARTE et al., 2024). Anterior a isso, três novas espécies de *Cytauxzoon* haviam sido identificadas em felinos silvestres na Europa (PANAIT et al., 2021). Os estudos que descreveram essas novas espécies destacaram que estas poderiam ter sido erroneamente identificadas como *Cytauxzoon felis* em análises moleculares anteriores. Isso ocorreu porque essas análises frequentemente utilizavam fragmentos curtos (entre 100 e 600 pb) do gene 18S rRNA, o que não permitia um posicionamento filogenético preciso, levando a possíveis classificações equivocadas como *C. felis*.

(PANAIT et al., 2021; DUARTE et al., 2024). Além disso, foi relatada, anteriormente, a identificação de uma nova espécie de *Cytauxzoon* em amostras de dois gatos-de-Pallas (*Otocolobus manul*), previamente sugerida como uma possível nova espécie. Essa espécie foi formalmente nomeada como *Cytauxzoon manul* e foi a segunda espécie descrita com capacidade de infectar felinos (REICHARD et al., 2005). Ao analisar os achados desses estudos, que identificaram novas espécies de *Cytauxzoon* com base em análises filogenéticas de fragmentos de DNA maiores que 1.000 pb e, muitas vezes, fazendo a caracterização com fragmentos também longos de outras genes, é possível inferir que os resultados obtidos no presente estudo, utilizando amostras de gatos domésticos do Distrito Federal, realizaram o posicionamento filogenético adequado das espécies identificadas como *Cytauxzoon brasiliensis*.

A árvore filogenética foi realizada com as cinco amostras que apresentavam os fragmentos de DNA com mais de 1.000 pb no sequenciamento e demonstrou que a espécie de *Cytauxzoon* dos gatos domésticos no DF encontra-se no mesmo clado que a espécie *Cytauxzoon brasiliensis* (PP583821 e PP588457) previamente identificada (DUARTE et al., 2024) e distinta das demais espécies, incluindo *Cytauxzoon felis*, descrita nos Estados Unidos. Esta análise reforça que a identidade da espécie infectante dos gatos do presente estudo é o *C. brasiliensis*. É possível visualizar na árvore que, no clado brasileiro, encontra-se o *C. brasiliensis*, dois indivíduos identificados como *C. felis* (DQ382277 e GU903911) e as cinco espécies do presente estudo (**Figuras 3 e 4**). Como essas duas espécies (DQ382277 e GU903911) que anos atrás foram classificadas como *C. felis* infectando felinos silvestres e a análise foi realizada com base em fragmento parcial do gene 18S rRNA (PEIXOTO, et al. 2007; FILONI et al, 2012), encontram-se na mesma linha que o *C. brasiliensis*, uma espécie que foi identificada e caracterizada com base em dois genes (18S rDNA e Cytb), e desse modo estão posicionadas em um clado distinto que a espécie americana *C. felis*, pode-se supor que essas duas amostras foram classificadas de forma equivocada como *C. felis* e possivelmente precisam ser reanalisadas para uma revisão nessa classificação.

Um estudo conduzido com três gatos domésticos da região de Úmbria, Itália, realizou uma análise filogenética utilizando amostras de *Cytauxzoon* spp. depositadas no GenBank. Ao observar a árvore filogenética, é possível ver que a espécie *Cytauxzoon felis* encontra-se em um clado distinto dos isolados de *Cytauxzoon* spp. reportados no Brasil. Essa separação em dois cladros diferentes é sustentado por um valor de bootstrap >70% (ANTOGNONI et al., 2022). A árvore filogenética apresentada no estudo, que identificou três novas espécies de *Cytauxzoon* na Europa, também demonstra que os isolados de *Cytauxzoon* spp. brasileiros encontram-se em um clado distinto dos isolados de *Cytauxzoon felis* americanos (PANAIT et al., 2021). O posicionamento dos isolados brasileiros e dos isolados americanos em dois cladros diferentes nas árvores desses dois artigos corrobora o observado na árvore do presente estudo. Este é o primeiro trabalho que identifica a espécie de *Cytauxzoon brasiliensis* como a espécie infectante dos gatos domésticos no Brasil.



**Figura 3:** Árvore filogenética circular de máxima verossimilhança do gênero *Cytauxzoon*, com base em sequências de nucleotídeos de 18S rRNA (n = 126; 1.070 pb). A árvore foi enraizada utilizando *Hepatozoon* sp. (MH615006) como um grupo externo.



Um estudo com 69 amostras de gatos com *Cytauxzoon felis* realizou um experimento associando possíveis mutações no gene *Cytb* a resistências aos tratamentos para cytauxzoonose. Esse estudo, por meio da análise de três fragmentos do gene, demonstrou que o *Cytb* apresentava alta variabilidade genotípica, provavelmente devido ao fato desse gene ser um fragmento de DNA extracromossômico que fica dentro do apicoplasto ou mitocôndria. Foi observado a ocorrência de substituições de aminoácidos únicos em diferentes regiões dos fragmentos do gene, sendo algumas dessas substituições não sinônimas, o que resultava na mudança dos aminoácidos (SCHEREEG et al., 2013). Os achados desse estudo ajudam a justificar a não amplificação desses genes nos pacientes positivos para *Cytauxzoon brasiliensis* no gene 18S rDNA do presente trabalho. Logo, torna-se necessário trabalhar com amplificações de vários fragmentos menores deste gene, no intuito de favorecer o anelamento dos oligonucleotídeos e, consequentemente, sua amplificação, para posteriormente unir esses fragmentos, visando sequenciar o gene completo e, desta maneira, caracterizar o agente dessas amostras.

Dentre as espécies de *Cytauxzoon* identificadas até o momento, o *Cytauxzoon felis* é a espécie mais estudada, sendo endêmica em diversas regiões do Estados Unidos (KHANA et al., 2018; ZOU et al., 2019; FAGUNDES-MOREIRA, 2022; OLIVEIRA et al., 2022; ZIEMAN et al., 2023). Infecções por *C. felis* em gatos domésticos nos EUA foram associadas a casos fatais de cytauxzoonose durante muito tempo. Contudo, com o crescente aparecimento de casos documentados de gatos que sobreviveram a essa doença juntamente com relatos de casos assintomáticos, as infecções por esse agente vêm mudando esse status de doença fatal. Desse modo, é provável que gatos sobreviventes à cytauxzoonose desempenhem um papel importante como reservatório doméstico para infecções por *C. felis* para outros gatos (REICHARD et al., 2021). A patogenicidade da espécie de *Cytauxzoon* que circula nos gatos e felinos silvestres do Brasil ainda é desconhecida e pouco se sabe sobre a epidemiologia da cytauxzoonose no país. Embora no Rio de Janeiro tenha sido descrito o primeiro relato de caso de infecção por uma espécie de *Cytauxzoon*, em que o paciente foi a óbito, é relatado por outros autores que não houve caso de cytauxzoonose fatal em felinos domésticos no Brasil (MAIA et al., 2013; ANDRÉ et al., 2015).

### 5.3. Hematologia dos Piroplasmídeos

Quando avaliamos os parâmetros hematológicos dos gatos anêmicos positivos para *Cytauxzoon* spp. em comparação com os parâmetros dos gatos negativos, é possível observar que houve diferença significativa apenas nos valores de plaquetas ( $P < 0,05$ ). Os animais que eram positivos para infecção por *Cytauxzoon* spp. tendiam a apresentar valores mais baixos de plaquetas em relação aos pacientes negativos. Além disso, não foram observadas diferenças nos parâmetros eritrocitários ou leucocitários entre esses grupos (**Tabela 4**). Em outras amostras de gatos do Distrito Federal, Brasil, também não foi observada diferenças significativas entre os parâmetros hematológicos dos animais negativos e positivos para *Cytauxzoon* spp. Esse estudo demonstrou não existir diferenças significativas para a ocorrência de anemia, leucopenia, trombocitopenia entre os grupos de animais positivos ou negativos para piroplasmídeos, bem como não encontraram

estruturas sugestivas de piroplasmídeos na população de gatos do estudo (OLIVEIRA et al., 2022).

**Tabela 4:** Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais positivos e negativos para o gene 18S rDNA do grupo dos gatos anêmicos do laboratório OHV.

| Parâmetros Hematológicos         | Animais Negativos |               | Animais Positivos |               | P-Valor             | Valores de Referência |
|----------------------------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|---------------------|-----------------------|
|                                  | Média             | Desvio Padrão | Média             | Desvio Padrão |                     |                       |
| Hematócrito (%)                  | 15,34             | 5,55          | 15,73             | 5,17          | 0,7737 <sup>◇</sup> | 24 - 45               |
| Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μl)  | 2,84              | 1,28          | 3,05              | 1,23          | 0,5056 <sup>¤</sup> | 5,0 - 10,0            |
| Hemoglobina (g/dl)               | 5,03              | 1,71          | 5,19              | 1,84          | 0,7318 <sup>◇</sup> | 8 - 15                |
| VCM (fl)                         | 57,07             | 11,75         | 56,02             | 10,63         | 0,7173 <sup>¤</sup> | 39-55                 |
| CHCM (%)                         | 32,37             | 1,74          | 33,05             | 1,19          | 0,0921 <sup>¤</sup> | 30 - 36               |
| Leucócitos (μl)                  | 19.283            | 20.717        | 15.409            | 13.276        | 0,5810 <sup>¤</sup> | 5.500 -19.500         |
| Metamielócitos (μl)              | 22                | 147           | 29                | 129           | 0,2753 <sup>¤</sup> | 0                     |
| Bastonetes (μl)                  | 405               | 1.625         | 194               | 471           | 0,2708 <sup>¤</sup> | 0-300                 |
| Neutrófilos (μl)                 | 13.231            | 17.684        | 11.818            | 11.287        | 0,9846 <sup>¤</sup> | 2;500 -12.500         |
| Linfócitos (μl)                  | 4.665             | 8.398         | 2.512             | 2.456         | 0,2254 <sup>¤</sup> | 1.500 - 7.000         |
| Monócitos (μl)                   | 796               | 1.838         | 659               | 1.726         | 0,2753 <sup>¤</sup> | 0 - 850               |
| Eosinófilos (μl)                 | 162               | 246           | 197               | 311           | 0,6131 <sup>¤</sup> | 0 - 1.500             |
| Basófilos (μl)                   | 2                 | 14            | 0                 | 0             | 0,4643 <sup>¤</sup> | 0 -1                  |
| PPT (g/dl)                       | 7,8               | 1,6           | 7,9               | 1,6           | 0,7579 <sup>¤</sup> | 6,0 – 8,0             |
| Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl) | 190 <sup>a</sup>  | 174           | 300 <sup>b</sup>  | 236           | 0,0460 <sup>¤</sup> | 195 – 624             |

**Legenda:** As médias seguidas de letras diferentes diferiram significativamente (P < 0,05). **Onde:** ◇, Teste paramétrico; ¤, Teste não paramétrico; VCM, Volume corpuscular médio; CHCM, Concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT, Proteínas plasmáticas totais.

Por outro lado, ao analisarmos as onze amostras do banco de DNA do laboratório, previamente positivas nas PCR de triagem para piroplasmídeos, observamos que esses animais não apresentavam anemia. Em um dos pacientes positivos para *Cytauxzoon brasiliensis*, foram visualizadas inclusões sugestivas de piroplasmídeos em lâminas, e esse gato apresentava leucocitose de 42.500μl. Outros dois felinos apresentavam leucopenia (3.500μl e 4.400μl), sendo que um deles teve o diagnóstico por *Cytauxzoon brasiliensis* confirmado pelo sequenciamento, enquanto o outro não foi sequenciado. Os demais animais desse grupo não apresentaram nenhuma alteração hematológica. Ao avaliar o histórico clínico dos três animais que apresentaram alterações na série branca, observa-se que os dois animais leucopênicos possuíam doenças não correlacionadas à infecção pelo parasito. Um desses gatos apresentava dermatite alérgica, e o outro doença periodontal e cardiopatia. O paciente que apresentava leucocitose estava realizando uma avaliação clínica, pois tinha acabado de ser resgatado e apresentava apenas lesões nos coxins. Os demais pacientes não apresentavam alterações que pudessem ser associadas à infecção por hemoparasitas, pois os motivos das consultas incluíam epilepsia, doença renal crônica ou pré-operatório de castração. Desse modo, pode-se supor que a infecção por *Cytauxzoon* spp. foi um achado laboratorial.

Um estudo realizado no Distrito Federal, Brasil, demonstrou que os achados clínico-patológicos observados nos animais infectados eram mais parecidos com os descritos em gatos na Europa, onde os animais não apresentavam doença clínica,

diferentemente dos sinais clínicos comumente relatados em gatos dos Estados Unidos, que desenvolviam quadros agudos de cytauxzoonose. Neste estudo, os autores sugerem que os achados dão maior suporte à possibilidade de o *Cytauxzoon* spp. infectando os gatos da América do Sul seja uma cepa ou espécie diferente, com menor patogenicidade em comparação ao *Cytauxzoon felis*. Contudo, o estudo comenta que, por não terem trabalhado com animais gravemente doentes, não se pode descartar a possibilidade de que esses animais tenham passado por uma fase de esquizogonia autolimitante e se tornado portadores crônicos do *Cytauxzoon* spp., podendo, desse modo, em algum momento, terem se recuperado da doença clínica e não terem sido assintomáticos durante todo o período da infecção, ou mesmo não terem apresentado sinais semelhantes aos observados nas infecções por *C. felis* nos EUA (OLIVEIRA et al., 2022). Esses achados são corroborados com os encontrados por outros autores que demonstraram infecções em gatos domésticos assintomáticos (MOGHADDAM et al., 2020; ANDRÉ et al., 2022).

Em outro estudo, gatos positivos e aparentemente saudáveis apresentaram leucocitoses por neutrofilia com discreto desvio à esquerda, além de monocitose e trombocitose durante a avaliação hematológica. Como achados hematológicos adicionais, foi visualizada uma estrutura sugestiva de piroplasmas no esfregaço sanguíneo (RAIMUNDO et al., 2021). Em estudos das regiões de Minas Gerais e São Paulo, também foram visualizadas estruturas sugestivas de piroplasmas nos esfregaços sanguíneos. Os autores relataram que os gatos positivos para *Cytauxzoon* spp. eram animais aparentemente saudáveis e que haviam sido apenas submetidos à castração. Os autores acreditam que esses gatos tenham sido infectados por uma cepa menos patogênica do *Cytauxzoon* spp. (ANDRÉ et al., 2022). Os relatos apresentados por todos esses autores, juntamente com os achados observados nos animais do grupo de amostras do banco de DNA analisados no presente trabalho, demonstram que gatos domésticos do Distrito Federal, sem indícios de doença clínica, podem provavelmente apresentar infecção por *Cytauxzoon brasiliensis*.

É provável que os gatos positivos possam apresentar hemácias infectadas por um longo período, atuando, assim, como possíveis reservatórios do parasito no Brasil. No entanto, para confirmar tal hipótese, torna-se necessário realizar infecções experimentais (ANDRÉ et al. 2022). Até o momento, não foram relatados esquizontes infectando células fagocíticas mononucleares em infecções por esse hemoparasita nos felinos domésticos brasileiros. Embora haja o relato de um caso de infecção por *Cytauxzoon* spp. no qual o gato evoluiu a óbito poucos dias após o diagnóstico, os autores desse relato sugerem que provavelmente esse desfecho do quadro clínico do animal ocorreu devido às complicações clínicas e hematológicas desenvolvidas pela coinfeção por hemoplasmas. Isso leva a supor que o óbito do animal não foi causada pela cytauxzoonose, assim como outros autores têm relatado a ausência de casos fatais relacionados a essa síndrome. Esses dados sugerem que, possivelmente, existem diferentes isolados de *Cytauxzoon* spp. circulando no país, os quais podem apresentar patogenicidade diferente da espécie *Cytauxzoon felis* (MAIA et al., 2013; ANDRÉ et al. 2022).



#### 5.4. Análise das Coinfecções

Embora tenhamos utilizado amostras de pacientes anêmicos com o intuito de aumentar a possibilidade de identificar animais infectados por *Cytauxzoon* spp., também aumentamos as chances de encontrar coinfecções por outros agentes, o que pode ser considerado um ponto negativo do trabalho. Porém, mesmo realizando a triagem dessa maneira, identificamos que 41,67% (10/24) dos animais não apresentavam coinfecções. Infelizmente, o presente trabalho não teve acesso a informações sobre o quadro clínico dos pacientes deste grupo, impossibilitando avaliar se a infecção por *Cytauxzoon brasiliensis* ou as coinfecções resultaram no óbito ou, ainda, se houve cura clínica dos gatos. Nos Estados Unidos, foi realizado um estudo recente do tipo caso-controle, que avaliou 229 animais divididos em 39 positivos para *Cytauxzoon* spp. e 190 negativos. Nesse estudo, foi observado que a anemia estava presente em 35,9% (14/39) dos gatos positivos, e não houve uma associação de infecção com a anemia quando comparado ao grupo controle. No entanto, ao avaliar os animais com base na ausência de sinais clínicos, os casos de anemia eram mais frequentes nos animais positivos. Por outro lado, ao analisar os animais que apresentavam sinais clínicos, foi observado que a anemia não estava associada à infecção. Nesse estudo, foi relatado que os sinais clínicos observados nos animais positivos eram inespecíficos (sinais neurológicos, emagrecimento, diarreia, estomatite, dermatite, entre outros) (CARLI et al., 2022). A anemia ocorre frequentemente nos estágios iniciais de infecção dos eritrócitos, mas, quando os gatos sobrevivem ao estágio de esquizogonia da doença, esses animais podem manter níveis baixos de piroplasmas nas hemácias por período indefinido, mesmo sem a doença clínica, tornando-se persistentemente infectados (SLEZNIKOW et al., 2021; REICHARD et al. 2021). Os achados hematológicos mais comumente associados à infecção por *Cytauxzoon* spp. são citopenias, anemia, leucopenia com granulação tóxica, linfopenia e trombocitopenia (OLIVEIRA et al., 2022).

Ao avaliar os ensaios moleculares para possíveis coinfecções por FIV, FeLV e hemoplasmas, realizados nos pacientes do grupo dos animais anêmicos oriundos do laboratório particular, foram obtidos os resultados descritos na **tabela 2**. Observou-se que 58,33% (14/24) desses pacientes apresentavam coinfecções por um ou mais desses agentes, como é possível visualizar na **tabela 5**. Entre esses pacientes, 28,57% (4/14) eram positivos apenas para FELV, 28,57% (4/14) tinham coinfecção apenas por hemoplasma, 28,57% (4/14) eram infectados tanto com hemoplasmas quanto com FeLV e 14,29% (2/14) eram FIV e FeLV positivos. Um estudo com gatos de três estados brasileiros avaliou possíveis coinfecções de *Cytauxzoon* spp. com outros agentes infecciosos. Entre as amostras analisadas, 10 apresentavam coinfecção, sendo 8 animais infectados por *Cytauxzoon* spp. e *Anaplasma* spp., um por *Cytauxzoon* spp. e *Ehrlichia* spp. e um por *Cytauxzoon* spp. e *Babesia vogeli*. Nesse estudo, não foram realizadas análises hematológicas para avaliar os efeitos dessas coinfecções nos exames hematológicos desses animais (ANDRÉ et al., 2022).

**Tabela 5:** Resultados das PCR para coinfeção por hemoplasma, FeLV e FIV dos gatos anêmicos positivos no gene 18S rDNA.

| Pacientes     | Hemoplasmas | FeLV      | FIV      |
|---------------|-------------|-----------|----------|
| 1             | -           | +         | +        |
| 2             | -           | +         | -        |
| 3             | +           | +         | -        |
| 4             | -           | -         | -        |
| 5             | +           | -         | -        |
| 6             | +           | -         | -        |
| 7             | -           | -         | -        |
| 8             | +           | -         | -        |
| 9             | -           | -         | -        |
| 10            | -           | +         | +        |
| 11            | +           | +         | -        |
| 12            | -           | +         | -        |
| 13            | -           | -         | -        |
| 14            | -           | -         | -        |
| 15            | -           | -         | -        |
| 16            | -           | +         | -        |
| 17            | -           | -         | -        |
| 18            | +           | -         | -        |
| 19            | +           | +         | -        |
| 20            | -           | +         | -        |
| 21            | -           | -         | -        |
| 22            | -           | -         | -        |
| 23            | -           | -         | -        |
| 24            | +           | +         | -        |
| <b>TOTAL:</b> | <b>8</b>    | <b>10</b> | <b>2</b> |

Onde: FeLV, Vírus da Leucemia Felina; FIV, Vírus da imunodeficiência felina.

### 5.5. Hematologia das Coinfecções

Ao comparar os valores hematológicos dos grupos de animais infectados apenas por *Cytauxzoon* spp. com os que apresentaram alguma coinfeção, podemos observar que existem diferenças significativas nos parâmetros de hematócrito, número de hemácias e VCM ( $p < 0,05$ ). Demonstra-se, dessa forma, que os pacientes que possuíam coinfecções apresentavam quadros de anemias mais graves e macrocitoses em relação aos que não possuíam coinfecções (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais com e sem coinfeções e de cada coinfeção do grupo dos gatos anêmicos do laboratório OHV.

| Parâmetros hematológicos         | Sem coinfeção      |        | Com coinfeção       |        | Coinfeção           |       |                    |        |                    |       |                     |        | Valores de Referência |
|----------------------------------|--------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|-------|--------------------|--------|--------------------|-------|---------------------|--------|-----------------------|
|                                  |                    |        |                     |        | Hemoplasmas         |       | FeLV               |        | FIV e FeLV         |       | Hemoplasmas e FeLV  |        |                       |
|                                  | Média              | DP     | Média               | DP     | Média               | DP    | Média              | DP     | Média              | DP    | Média               | DP     |                       |
| Hematócrito (%)                  | 18,22 <sup>a</sup> | 4,27   | 13,96 <sup>⁎b</sup> | 5,15   | 18,48 <sup>a</sup>  | 3,5   | 15,85 <sup>a</sup> | 4,45   | 10,55 <sup>a</sup> | 0,92  | 9,25 <sup>⁎b</sup>  | 3,66   | 24 - 45               |
| Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μl)  | 3,67 <sup>a</sup>  | 0,99   | 2,61 <sup>⁎b</sup>  | 1,22   | 3,77 <sup>a</sup>   | 0,55  | 2,98 <sup>a</sup>  | 1,31   | 1,74 <sup>a</sup>  | 0,37  | 1,52 <sup>⁎b</sup>  | 0,57   | 5,0 - 10,0            |
| Hemoglobina (g/dl)               | 5,97 <sup>a</sup>  | 1,34   | 4,63 <sup>a</sup>   | 1,98   | 5,9 <sup>a</sup>    | 1,15  | 5,7 <sup>a</sup>   | 2,27   | 3,45 <sup>a</sup>  | 0,49  | 2,88 <sup>⁎b</sup>  | 1,33   | 8 - 15                |
| VCM (fl)                         | 50,79 <sup>a</sup> | 6,54   | 59,76 <sup>⁎b</sup> | 11,58  | 47,5 <sup>a</sup>   | 4,63  | 59,85 <sup>a</sup> | 2,47   | 61,65 <sup>a</sup> | 7,85  | 70,98 <sup>⁎b</sup> | 12,76  | 39-55                 |
| CHCM (%)                         | 33,38              | 1,40   | 32,82               | 1,01   | 32,58               | 0,61  | 33,73              | 0,92   | 32,6               | 1,84  | 32,28               | 0,66   | 30 - 36               |
| Leucócitos (μl)                  | 18.180             | 14.696 | 13.430              | 12.336 | 7.550               | 2.891 | 23.300             | 16.499 | 6.550              | 3.041 | 12.881              | 12.693 | 5.500 -19.500         |
| Metamielócitos (μl)              | 7                  | 22     | 45                  | 169    | 0                   | 0     | 0                  | 0      | 0                  | 0     | 158 <sup>bv</sup>   | 316    | 0                     |
| Bastonetes (μl)                  | 258                | 624    | 148                 | 343    | 121                 | 167   | 82                 | 164    | 0                  | 0     | 315 <sup>b</sup>    | 631    | 0-300                 |
| Neutrófilos (μl)                 | 15.084             | 14.026 | 9.486               | 8.669  | 5.573 <sup>al</sup> | 2.849 | 15.067             | 11.180 | 5.718              | 3.357 | 9.702               | 10.831 | 2;500 -12.500         |
| Linfócitos (μl)                  | 2288               | 1.610  | 2.672               | 2.968  | 1.345               | 796   | 5539               | 4493   | 702                | 377   | 2.116               | 996    | 1.500 - 7.000         |
| Monócitos (μl)                   | 333                | 278    | 892                 | 2.253  | 413                 | 372   | 2.394              | 4.193  | 131                | 61    | 250                 | 156    | 0 - 850               |
| Eosinófilos (μl)                 | 210                | 288    | 188                 | 336    | 99                  | 124   | 218                | 438    | 0                  | 0     | 341                 | 467    | 0 - 1.500             |
| Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl) | 367                | 243    | 253                 | 228    | 244                 | 161   | 192                | 173    | 496                | 571   | 201                 | 111    | 195 – 624             |
| PPT (g/dl)                       | 8,1                | 1,5    | 7,8                 | 1,7    | 8,6                 | 2,5   | 7,4                | 0,7    | 7,3                | 1,3   | 7,6                 | 1,9    | 6,0 – 8,0             |

**Legenda:** As médias seguidas de letras diferentes diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ). **Onde:** ✧, Teste paramétrico; ✧, Teste não paramétrico; VCM, Volume corpuscular médio; CHCM, Concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT, Proteínas plasmáticas totais.

Quando comparado os grupos de diferentes tipos de coinfeção com aqueles sem coinfeção, não foi observada diferença significativa nos parâmetros hematológicos dos animais coinfectados por hemoplasma, FeLV ou FIV/FeLV ( $P > 0,05$ ). No entanto, ao comparar os animais sem coinfeção com aqueles coinfectados por hemoplasmas associado a FeLV, observou-se uma diferença significativa na maioria dos parâmetros eritrocitários ( $P < 0,05$ ), sendo possível observar que alguns animais apresentaram anemia mais graves, possivelmente devido à coinfeção por três agentes infecciosos. Contudo, é importante destacar que, devido ao tamanho reduzido da amostra, a divisão dos animais em grupos distintos resultou em um número amostral pequeno para cada grupo, o que pode ter causado vieses nos resultados.

Estudos relatam casos de coinfeção de *Cytauxzoon* spp. com agentes como *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., FIV e FeLV. Em casos isolados, gatos infectados apresentaram sintomas graves, como anemia e imunossupressão, sugerindo que a coinfeção pode agravar o quadro clínico, especialmente quando mais de dois patógenos estão presentes (MAIA et al., 2013; DE MELO et al., 2023). No entanto, alguns estudos relatam casos de animais sem sinais clínicos associados diretamente à infecção por *Cytauxzoon* spp., indicando que esses gatos poderiam ser portadores crônicos e assintomáticos (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; ANDRÉ et al., 2017). Não foi observada maior suscetibilidade de infecção por *Cytauxzoon* spp. nos gatos FIV positivos (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; DE MELO et al., 2023). Resultados de pesquisas europeias confirmam a presença de *Cytauxzoon* spp. e sua associação frequente com FIV e hemoplasmas, mas sugerem que os sintomas graves geralmente se devem a outras condições concomitantes (ANTOGNONI et al., 2022; WILLI et al., 2022).

## 6. CONCLUSÕES

As análises moleculares demonstraram que *Cytauxzoon brasiliensis* foi a espécie infectante dos gatos domésticos deste estudo. Os animais infectados por essa espécie apresentam poucas alterações hematológicas. Essa observação pode indicar uma variação genotípica ou uma baixa patogenicidade do *C. brasiliensis*, sendo necessário mais estudos para confirmar tal hipótese.

A análise dos animais do presente estudo revelou que a presença de múltiplos patógenos pode agravar o quadro clínico do gato, especialmente os animais anêmicos, o que enfatiza a necessidade de diagnósticos completos e cuidadosos, sendo importante investigar possíveis coinfeções, como as que envolvem FeLV, FIV e hemoplasmas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTOIGNONI, Maria Teresa; ROCCONI, Francesca; RAVAGNAN, Silvia; VASCELLARI, Marta; CAPELLI, Gioia; MIGLIO, Arianna; DI TOMMASO, Morena. ***Cytauxzoon* sp. infection and coinfections in three domestic cats in Central Italy.** Veterinary Sciences, v. 9, n. 50, 2022.
- ANDRÉ, Marcos R.; ADANIA, Cristina H.; MACHADO, Rosângela Z.; ALLEGRETI, Silmara M.; FELIPPE, Paulo A. N.; SILVA, Ketty F.; NAKAGHI, Andréa C. H.; DAGNONE, Ana S. **Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids.** Journal of Wildlife Diseases, v.45, n. 1, p. 234-237, 2009.
- ANDRÉ, Marcos Rogério; HERRERA, Heitor Miraglia; FERNANDES, Simone de Jesus; DE SOUSA, Keyla Cartens Marques; GONÇALVES, Luiz Ricardo; DOMINGOS, Iara Helena; DE MACEDO, Gabriel Carvalho; MACHADO, Rosângela Zacarias. **Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 6, p. 779-786, 2015.
- ANDRÉ, Marcos Rogério; FILGUEIRA, Kilder Dantas; CALCHI, Ana Cláudia; SOUSA, Keyla Carstens Marques de; GONÇALVES, Luiz Ricardo; MEDEIROS, Vitor Brasil; XIMENES, Poliana Araújo; LELIS, Ivana Cristina Nunes Gadelha; MEIRELES, Maria Vanuza Nunes de; MACHADO, Rosângela Zacarias. **Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats.** Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 26, n.4, p. 525-531, 2017.
- ANDRÉ, Marcos Rogério; CALCI, Ana Cláudia; FURQUIM, Maria Eduarda Chiaradia; DE ANDRADE, Isabela; ARANTES, Paulo Vitor Cadina; LOPES, Lara Cristina de Melo; DEMARCHI, Iuri Kauan Lins do Nascimento; FIGUEIREDO, Mayra Araguaia Pereira; LIMA, Cirilo Antonio de Paula; MACHADO, Rosângela Zacarias. **Molecular detection of tick-borne agents in cats from Southeastern and Northern Brazil.** Pathogens, v. 11, n. 106, 2022.
- BIRKENHEUER, Adam J.; LEVY, Michael G. BREITSCHWERDT, Edward B. **Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples.** Journal of Clinical Microbiology, v.41, p. 4172-4177, 2003.
- CRIADO-FORNELIO, A.; MARTÍNEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, 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, p. 307-317, 2003.
- CARLI, Erika; SOLANO-GALLEGO, Laia; DE ARCANGELI, Stefano; VENTURA, Laura; LIGORIO, Elisa; FURLANELLO, Tommaso. **Clinicopathological findings and risk factors associated with *Cytauxzoon* spp. infection in cats: a case-control study (2008-2021).** Front. Vet. Sci, v.9, 2022.

- DE MELO, Thyara Bezerra; SILVA, Tatiene Rossana Mota; DE ALMEIDA, Telga Lucena Alves Craveiro; TUTIJA, Franciele; DA SILVA, Angélica Oliveira; LIRA, Mariana da Silva; AMORIN, Débora; GIANNELLI, Alessio; RAMOS, Carlos Alberto do Nascimento; ALVES, Leucio Câmara; DE CARVALHO, Gílcia Aparecida. RAMOS, Rafael Antonio Nascimento. **Molecular detection of vector-borne pathogens in cats tested for FIV and FeLV.** Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, n. 40, 2023.
- DUARTE, Matheus Almeida; OLIVEIRA, Camila Manoel de; HONORATO, Sandy Menezes; BATISTA, Liliane Maria do Rosario; MENDONÇA, Janaína Tavares; SOUZA, Davi Emanuel Ribeiro de; HIRANO, Liria Queiroz Luz; ANDRÉ, Marcos Rogério; CASTRO, Márcio Bortelho de; PALUDO, Giane Regina. ***Cytauxzoon brasiliensis* sp. Nov. (Apicomplexa: Theileriidae), a new species infecting a little-spotted-cat (*Leopardus tigrinus*) (Carnivora: Felidae) from Brazil.** Systematic Parasitology, v. 101, n. 53, 2024.
- FAGUNDES-MOREIRA, Renata; SOUZA, Ugo Araújo; MAY-JUNIOR, Joares Adenilson; BAGGIO-SOUZA, Vinícius; BERGER, Laura; WAGNER, Paulo Guilherme Carniel; MAZIM, Fabio Dias; PETERS, Felipe Bortolotto; FAVARINI, Marina Ochoa; TORTATO, Marcos Adriano; ALBANO, Ana Paula N.; FAGUNDES, Darwin Dias; HABERFELD, Mario B.; SARTORELO, Leonardo R.; RANPIM, Lilian Elaine; FRAGOSO, Carlos Eduardo; GIROTTO-SOARES, Aline; MARTINS, Thiago F.; VALLE, Stella de Faria; SOARES, João Fabio. **Epidemiological compatibility of *Amblyomma sculptum* as possible vector and *Panthera onca* as reservoir of *Cytauxzoon* spp. in midwestern Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 13, 2022.
- FILONI, Claudia; CATÃO-DIAS, José Luiz; CATTORI, Valentino; WILLI, Barbara; MELI, Marina L.; CORRÊA, Sandra Helena Ramiro; MARQUES, Mara Cristina; ADANIA, Cristina Harumi; SILVA, Jean Carlos Ramos; MARVULO, Maria Fernanda Vianna; NETO, José Soares Ferreira; DURIGON, Edison Luiz; DE CARVALHO, Vania Maria; COUTINHO, Selene Dall'Acqua; LUTZ, Hans; HOFMANN-LEHMANN, Regina. **Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropic and exotic felids.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 24, n. 1, p. 166-173, 2012.
- GONÇALVES, J. A. C. N; CAPANEMA, N. P; PINHO, V. S; CASTRO, B. G; TANCREDI, I. P; RAIA, V. A. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitose em gatos domésticos (*Felis catus*) da região Amazônica Mato-Grossense.** Scientific Electronic Archives, v. 13, 2021.
- HOHDATSU, Tsutomu; MOTOKAWA, Kenji; USAMI, Maromi; AMIOKA, Midori; OKADA, Susumu; KOYAMA, Hiroyuki. **Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene.** Journal of Virological Methods, v. 70, p. 107-111, 1998.

- KHANA, Daven B.; PETERSON, David S.; STANTON, James B.; SCHEREEG, Megan E. BIRKENHEUER, Adam J.; TARIGO, Jaime L. **Genetic conservation of *Cytauxzoon felis* antigens and mRNA expression. In the schizont life-stage.** Veterinary Parasitology, v. 263, p. 49-53, 2018.
- JAIN, Nemi Chand. **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia, cap. 14, p. 247-257, 1.993.
- KERBER, Sheila Simone. **Predação por gatos domésticos (*Felis catus*) em ambiente urbano, Florianópolis, Santa Catarina.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação): Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas 2017. 59p.
- MACHADO, Daiana de Souza; MACHADO, Juliana Clemente; SOUZA José Olimpio Tavares de; SANT'ANNA, Aline Cristina. **A importância da guarda responsável de gatos domésticos: aspecto práticos e conexões com o bem-estar animal.** Revista Acadêmica Ciência Animal, v.17, 2019.
- MAIA, Leticia Mendes Pupio; CERQUEIRA, Aloysio de Mello Figueiredo; MACIEIRA, Daniel de Barros; SOUZA, Aline Moreira de; MOREIRA, Namir Santos; SILVA, Adrianna Vieira da; MESSICK, Joanne Belle; FERREIRA, Renata Fernandes; ALMOSNY, Nádia Regina Pereira. ***Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria, v. 22, n.2, p. 289-291, 2013.
- MENDES-DE-ALMEIDA, Flavya; LABARTHE, Norma, GUERRERO, Jorge; FARIA, Maria Carolina Ferreira; BRANCO, Aline Serricella; PEREIRA, Cássia Dias; BARREIRA, Jairo Dias; PEREIRA, Maria Julia Salim. **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, v. 147, p. 9-15, 2007.
- MIYAZAWA, T.; JARRETT, O. **Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats.** Archives of Virology, v.142, p. 323-332, 1997.
- MOGHADDAM, Mina Rahmati; ZAEEMI, Mahdieh; RAZMI, Gholam Reza. **Preliminary study of *Cytauxzoon felis* infection in outdoor cats in Mashhad, Iran.** Parasitology Research, v. 119, p. 4177-4183, 2020.
- OLIVEIRA, Camila Manoel de; YANG, Sharon; DUARTE, Matheus Almeida; FIGUEIREDO, Daniela Maciel; BATISTA, Liliane Maria do Rosario; MARR, Henry; MCMANUS, Concepta Margaret; ANDRÉ, Marcos Rogério; BIRKENHEUER, Adam Joseph; Paludo, Giane Regina. **Piroplasmid infection is not associated with clinicopathological and laboratory abnormalities in cats from Midwestern Brazil.** Parasitology Research, n.9, p. 2561-2570, 2022.
- OLMEDA, A. S; ARMSTRONG, P. M.; ROSENTHAL, B. M.; VALLADARES, B.; DEL CASTILHO, A.; DE ARMAS, F.; MIGUELEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, J. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD III, S. R. **A subtropical case of human babesiosis.** Acta Tropica, v. 67, p. 229-234, 1997.



- PANAIT, Luciana Cătălina; MIHALCA, Andrei Daniel; MODRÝ, David; JURÁNKOVÁ, Jana; IONICĂ, Angela Monica; DEAK, Georgiana; GHERMAN, Călin Mircea; HEDDERGOTT, Mike; HODŽIĆ, Adnan; VERONESI, Fabrizia; REICHARD, Mason; ZIEMAN, Elliott A.; NIELSEN, Clayton K.; JIMÉNEZ-RUIZ, Francisco Agustín; HRAZDILOVÁ, Kristýna. **Three new species of *Cytauxzoon* in European wild felids**. Veterinary Parasitology, v. 290, 2021.
- PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T. N.; BARROS, S. S. **Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil**. Veterinary Parasitology, v. 145, p. 383-387, 2007.
- RAIMUNDO, Juliana Macedo; GUIMARÃES, Andresa; ANDRÉ, Marcos Rogério; BALDANI, Cristiane Divan. ***Cytauxzoon felis* DNA detection in healthy cats from Rio de Janeiro, Brazil**. Journal of Parasitology, v. 107, n. 5, p. 676-678, 2021.
- REBOUÇAS, Emanuela de Lima; COSTA, José Jackson do Nascimento; PASSOS, Maria Juliane; PASSOS, José Renato de Sousa; HURK, Robert van den; SILVA, José Roberto Viana. **Real time PCR and importance of housekeeping gene for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 56, n. 1, 2013.
- REICHARD, Mason V.; BUSSCHE, Ronald A. Van Den; MEINKOTH, James H.; HOOVER, John P.; KOCAN, A. Alan. **A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids**. Journal of Parasitology, v. 92, n. 2, p. 420-426, 2005.
- REICHARD, Mason V.; SANDERS, Tiana L.; WEERARATHNE, Pabasara; MEINKOTH, James H.; MILLER, Craig A.; SCIMECA, Ruth C.; ALMAZÁN, Consuelo. **Cytauxzoonosis in North America**. Pathogens, v. 10, 2021.
- SCHEREEG, Megan E.; MARR, Henry S.; TARIGO, Jaime L.; COHN, Leah A.; BIRD, David M.; SCHOLL, Elizabeth H.; LEVY, Michael G.; WIEGMANN, Brian M.; BIRKENHEUER, Adam J. **Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny**. Plos One v. 11, 2016.
- SCHEREEG, Megan E.; MARR, Henry S.; TARIGO, Jaime; COHN, Leah A.; LEVY, Michael G.; BIRKENHEUER, Adam J. **Pharmacogenomics of *Cytauxzoon felis* Cytochrome b: implications for Atovaquone and Azithromycin therapy in domestic cat with cytauxzoonosis**. Journal of Clinical Microbiology, v. 51, n. 9, p. 3.066-3.069, 2013.
- SLEZNIKOW, Casey R.; GRANICK, Leah A.; NAFE, Laura A.; RENDAHL, Aaron; BURTON, Erin N. **Evaluation of various sample sources for the cytologic diagnosis of *Cytauxzoon felis***. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 36, p. 126-132, 2022.
- TZAVARAS, Theodore; STEWART, Monica; MCDUGALL, Ann; FULTON, Ruth; TESTA, Nydia; ONIONS, David E. NEIL, James C. **Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia**. Journal of General Virology, v. 71, p. 343-354, 1990.

- WANG, Jin-Lei; LI, Ting-Ting; LIU, Gou-Hua; ZHU, Xing-Quan; YAO<sup>b</sup>, Chaoqun. **Two tales of *Cytauxzoon felis* infections in domestic cats.** Clinical Microbiology Reviews, v. 30, 2017.
- WIKANDER, Yvonne M.; KANG, Qing; REIF, Kathryn. **Acute *Cytauxzoon felis* case in domestic cats from Eastern Kansas, a retrospective case-control study (2006-2019).** Veterinary Sciences, v. 7, n.c 205, 2020.
- WILLI, Barbara; MELI, Marina L.; CAFARELLI, Chiara; GILLI, Urs O.; KIPAR, Anja; HUBBUCH, Alina; RIOND, Barbara; HOWARD, Judith; SCHAARSCHMIDT, Daniel; REGLI, Walter; HOFMANN-LEHMANN, Regina. ***Cytauxzoon europaeus* infections in domestic cats in Switzerland and in European wildcats in France: a tale that started more than two decades ago.** Parasites & Vectors, v. 15, n. 19, 2022.
- YANG, Tzushan S.; REICHARD, Mason V.; THOMAS, Jennifer E.; MARR, Henry S.; KAROUNOS, Michael; HYATT, Julia; MILLER, Craig; BIRKENHEUER, Adam J. **Transmission of *Cytauxzoon felis* by injection of *Amblyomma americanum* salivary glands.** Parasitology International, v. 95, 2023.
- ZIEMAN, Elliott A.; JIMÉNEZ, F. Agustín; NIELSEN, Clayton K. **Concurrent examination of bobcats and ticks reveals high prevalence of *Cytauxzoon felis* in Southern Illinois.** Journal of Parasitology, v. 103, p. 343-348, 2017.
- ZIEMAN, Elliott A.; PHILLIPS, Victoria C.; JIMÉNEZ, F. Agustín; Clayton K.; JIMÉNEZ. **Clinical and subclinical *Cytauxzoon felis* infections in domestic cats from a recently identified endemic region.** Journal of Parasitology, v.109, n.5, p.525-529, 2023.
- ZOU, Feng-Cai; LI, Zhao; YANG, Jian-Fa; CHANG, Jiang-Yan; LIU, Guo-Hua; LV, Yan; ZHU, Xing-Quan. ***Cytauxzoon felis* infection in domestic cats, Yunnan Province, China, 2016.** Emerging Infectious Diseases, v. 25, n. 2, 2019.

## CAPÍTULO 3

### 1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo auxilia no entendimento da ocorrência e dos aspectos moleculares da infecção por *Cytauxzoon brasiliensis* em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil, ressaltando a importância dos estudos moleculares na caracterização dos hemoparasitas, especialmente aqueles do gênero *Cytauxzoon*, que infectam os felinos domésticos e silvestres no país. Esses estudos são fundamentais para expandir a compreensão sobre as espécies infectantes dos felinos.

Apesar de existirem poucos estudos sobre casos de *Cytauxzoon* spp. em felinos domésticos no Brasil, a maioria das análises moleculares foram feitas com base em curtos fragmentos de DNA, o que pode ter levado a possíveis erros na identificação da espécie. Há ainda menos trabalhos que correlacionem os achados hematológicos da infecção por esse parasito com os efeitos de coinfeção por outros agentes. Sendo o trabalho mais completo, o realizado por Oliveira et al., (2022), que apresentou uma abordagem voltada à caracterização dos casos de infecções por piroplasmídeos, associando características epidemiológicas, clínico-patológicas e moleculares dos gatos estudados.

O presente estudo apresenta alguns vieses, como o fato de as amostras selecionadas para os testes serem provenientes de animais anêmicos ou terem sido escolhidas por apresentarem resultados previamente positivos para piroplasmídeos. Dessa forma, é possível observar uma alta ocorrência de animais positivos. Para o objetivo desse estudo, que era principalmente a identificação da espécie de *Cytauxzoon* presente no Distrito Federal, essa abordagem favoreceu o estudo. No entanto, torna-se importante realizar novos estudos utilizando amostras randômicas, para assim ser possível avaliar a prevalência desse parasito no Distrito Federal, a real correlação entre a infecção por esse parasito e a ocorrência de animais anêmicos, ou mesmo compreender como ocorrem os casos de coinfeção desse parasito com outros agentes infecciosos de importância clínica para a saúde dos felinos.

Os resultados deste trabalho indicam que a infecção por *Cytauxzoon brasiliensis* em gatos domésticos, apresenta manifestação clínica mais brandas quando comparada às infecções causadas por *C. felis* nos Estados Unidos. A presença de coinfeções, como FeLV, FIV e hemoplasmas, reforça a importância de uma abordagem diagnóstica abrangente em felinos com alterações hematológicas, uma vez que essas coinfeções podem intensificar a gravidade dos sintomas, especialmente nos casos de anemia. Essa informação é essencial para que médicos veterinários considerem a possibilidade de múltiplos agentes infecciosos ao avaliar gatos com sinais inespecíficos, particularmente aqueles expostos a ambientes de alto risco para transmissão pelo vetor. Ao correlacionar as coinfeções aos quadros hematológicos graves por meio de um diagnóstico abrangente, o médico veterinário poderá adotar uma abordagem terapêutica mais eficaz.

Além disso, os achados deste trabalho sugerem que gatos domésticos assintomáticos ou que obtiveram a cura clínica podem atuar como reservatórios potenciais para o *Cytauxzoon* spp. no Brasil, contribuindo para a circulação do parasito entre populações de felinos.