



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

INFECÇÃO POR PIROPLASMÍDEOS EM CÃES E GATOS NO DISTRITO FEDERAL

CAMILA MANOEL DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA, DF
AGOSTO/2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

INFECÇÃO POR PIROPLASMÍDEOS EM CÃES E GATOS NO DISTRITO FEDERAL

ALUNA: CAMILA MANOEL DE OLIVEIRA
ORIENTADORA: GIANE REGINA PALUDO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 244D/21

BRASÍLIA, DF
AGOSTO/2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

INFECÇÃO POR PIROPLASMÍDEOS EM CÃES E GATOS NO DISTRITO FEDERAL

CAMILA MANOEL DE OLIVEIRA

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

APROVADA POR:

DRA. GIANE REGINA PALUDO, Universidade de Brasília

DR. CRISTIANO BARROS DE MELO, Universidade de Brasília

DR. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE, Universidade Estadual Paulista

DRA. DANIELI BROLO MARTINS, Universidade Federal de Goiás

BRASÍLIA/DF, 19 de Agosto de 2021

De Oliveira, C. M. **Infecção por Piroplasmídeos em cães e gatos no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 199 p. Tese de Doutorado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

De OLIVEIRA, Camila Manoel. **Infecção por Piroplasmídeos em cães e gatos no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2021, 199p. Tese. (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2021.

RESUMO

Piroplasmídeos são hemoprotozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa. Em cães e gatos, os gêneros mais importantes são *Babesia* spp. e *Theileria* spp., além de *Cytauxzoon* spp. e *Rangelia vitalii* somente em felinos e caninos, respectivamente. No Brasil, apesar de já terem sido descritos casos desses piroplasmídeos em cães e gatos, a caracterização clínica, laboratorial e molecular é incipiente. Com o objetivo de investigar a ocorrência, bem como de realizar a caracterização clínico-patológica dessas infecções, o presente estudo analisou amostras de sangue total de 276 cães e 171 gatos domésticos oriundos de Brasília, centro-oeste do Brasil. As amostras foram submetidas à Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR) direcionada ao gene mitocondrial LSU4. A ocorrência em cães foi de 9,7% (27/276) para *Babesia vogeli* e 1,44% (4/276) para Piroplasma sp. não identificado. Com relação aos felinos, foi observada a maior ocorrência de *Cytauxzoon* já descrita no país, de 7% (12/171), e 11,11% (19/171) para *Babesia vogeli*. Não foi detectada nenhuma amostra positiva para *Theileria* spp., tanto para cães quanto para gatos, tampouco para *Rangelia vitalii*. Em cães infectados foi observado risco 2,3 vezes maior de apresentar trombocitopenia, além de uma tendência a anemia, em comparação aos animais não infectados. Não houve diferença significativa na análise hematológica e bioquímica dos felinos. Todas as amostras positivas foram submetidas posteriormente à caracterização molecular por meio de PCR convencionais (cPCR) com o gene 18S rRNA e os marcadores mitocondriais cox-1 e Cytb. Em cães, a análise filogenética destacou a espécie *Babesia vogeli* como a mais prevalente em cães do Brasil, além de posicionar em clado distinto Piroplasmas não identificados. A rede de haplótipos realizada com sequências cox-1 dos cães e gatos positivos revelou a existência de seis haplótipos para *Babesia vogeli*, sendo que um mesmo haplótipo é compartilhado com isolados do Brasil, EUA e Índia. Nossos estudos sugerem a existência de um piroplasmídeo distinto de *B. vogeli* que infecta cães da região. Quanto aos felinos, a infecção por *Babesia vogeli* e *Cytauxzoon* sp. aparentemente não ocasiona alterações clínicas. Uma baixa variabilidade intraespecífica foi observada nas sequências cox-1 de *Babesia vogeli*.

Palavras-chave: Piroplasmas, PCR, Rede de Haplótipos

ABSTRACT

Piroplasmida are hemoprotozoans that belong to Apicomplexa phylum. In dogs and cats, they encompass the genera *Babesia* spp and *Theileria* spp, besides *Cytauxzoon* spp. and *Rangelia vitalii* only for felines and canids, respectively. In Brazil, although there are some cases of these piroplasms in dogs and cats, the clinical, laboratory and molecular characterization is incipient. To investigate the occurrence as well as the clinicopathological characterization of these infections, the current study analyzed total blood samples of 276 dogs and 171 domestic cats from Brasilia, Midwestern Brazil. All samples were carried out with the Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) using the mitochondrial gene LSU. The occurrence in dogs for *Babesia vogeli* was 9.7% (27/276), and 1.44% (4/276) for a non-identified Piroplasm sp. Regarding the felines, it has been observed the highest occurrence of *Cytauxzoon* sp. ever found in the country (7%; 12/171), and 11.11% (19/171) for *Babesia vogeli*. None of the samples were positive for *Theileria* spp., for both dogs and cats, neither for *Rangelia vitalii*. Infected dogs were 2.3 times at higher risk of having thrombocytopenia, in addition to a tendency of anemia, compared with the non-infected dogs. There was no significant difference concerning the hematologic and biochemistry analysis of cats. Subsequently, all positive samples were submitted to a conventional PCR characterization, using the 18S rRNA and the molecular markers *cox-1* and *Cytb*. For dogs, the phylogenetic analysis enhanced *Babesia vogeli* species as the most prevalent in Brazil, in addition to positioning the Piroplasm sp. in a distinct clade. The haplotype network was performed using the *cox-1* sequences from dogs and cats, which found six haplotypes for *Babesia vogeli*, one of them is shared with isolates from Brazil, the USA and India. Our studies suggest the presence of a piroplasm different from *Babesia vogeli* species, that infects dogs from the region. Regarding the felines, the infection by *Babesia vogeli* and *Cytauxzoon* sp. apparently did not show clinical relevance. A low intraspecific variability regarding *B. vogeli cox-1* gene sequences was found.

Keywords: Piroplasmida, PCR, Haplotype Network

Sumário

CAPÍTULO 1	12
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
Parte 1: Piroplasmas em felinos domésticos	13
1.1. Taxonomia dos piroplasmídeos em felinos.....	14
1.2. Agentes etiológicos	18
1.3. Distribuição geográfica e prevalência	19
1.4. Patogenicidade.....	24
1.5. Condições predisponentes e associações	26
.....	34
1.7. Infecção, manifestações clínicas e achados histopatológicos.....	34
1.8. Diagnóstico.....	36
1.9. Tratamento.....	42
Parte 2: Piroplasmas em caninos domésticos.....	44
2.1 Taxonomia dos piroplasmídeos em caninos	44
2.2 Agentes etiológicos	44
2.3 Distribuição geográfica e prevalência	46
2.4 Patogenicidade.....	57
2.5 Condições predisponentes e associações	59
2.6 Transmissão e ciclo biológico	60
2.7 Infecção, manifestações clínicas e achados histopatológicos.....	64
2.8 Diagnóstico.....	68
2.9 Tratamento.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CAPÍTULO 2	116
Clinicopathological and molecular characterization of Piroplasm infection in domestic cats from Brazil	116
Abstract	116
1. Introduction	117
2. Material and Methods	119
2.1 Animals and sampling sites	119
2.2 Hematological and biochemical analysis	119
2.3 Molecular analysis.....	120
2.3.1 DNA extraction	120

2.3.2 PCR assays	121
2.3.3 Amplicon purification, sequencing and BLAST analysis	124
2.3.4. Haplotype network.....	124
2.4. Statistical analysis.....	124
3. Results	125
3.1 Epidemiological and clinical findings.....	125
3.2 Hematological and biochemistry profile	126
3.3 Sequencing analysis.....	127
4. Discussion	137
5. Conclusion	142
6. References	143
CAPÍTULO 3	155
Canine piroplasms: a clinical, laboratory and molecular characterization from Brazil	155
Abstract	155
1. Introduction	156
2. Material and Methods	158
2.1 Animals and sampling sites	158
2.2 Hematological and biochemical analysis	159
2.3 Molecular analysis.....	160
2.3.1 DNA extraction	160
2.3.2 PCR assays	160
2.3.3 Amplicon purification, sequencing and BLAST analysis	163
2.3.4. Phylogenetic analysis	163
2.3.5. Haplotype network.....	163
2.4. Statistical analysis.....	164
3. Results	164
3.1 Epidemiological and clinical findings.....	164
3.2 Hematological and biochemistry profile	165
3.3 Sequencing analysis.....	166
4. Discussion	178
5. Conclusion	182
6. References	183
CAPÍTULO 4	198
Considerações finais	198

Lista de Figuras

Figura 1: Classificação taxonômica clássica dos piroplasmídeos encontrados em felinos.	14
Figura 2: Árvore filogenética de Piroplasmídeos utilizando sequências do gene 18S rRNA de espécies de <i>Cytauxzoon</i> , <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> . Em pontos vermelhos, os clados que compreendem os piroplasmídeos referidos como <i>Babesia</i> ; em azul, os piroplasmídeos referidos como <i>Theileria</i> ; em verde, os piroplasmídeos referidos como <i>Cytauxzoon</i> . (JALOVECKA et al., 2019).	15
Figura 3: Distribuição da <i>Cytauxzoonose</i> nos Estados Unidos. Fonte: (TARIGO et al., 2013).	22
Figura 4: Ciclo de transmissão do <i>Cytauxzoon felis</i> baseado em dados experimentais (ALLEN et al., 2019).	28
Figura 5: Ciclo de vida esquematizado do <i>Cytauxzoon felis</i> (WIKANDER; KANG; REIF, 2020).	32
Figura 6: Comparação do ciclo de vida de piroplasmas. Em A, ciclo de <i>Theileria</i> spp; B, <i>Babesia sensu strictu</i> ; C, grupo da <i>Babesia microti</i> (JALOVECKA et al., 2018).	33
Figura 7: Características morfológicas e de desenvolvimento de acordo com a taxonomia clássica dos piroplasmídeos. (JALOVECKA et al., 2019).	34
Figura 8: Diferenciação microscópica de <i>Cytauxzoon felis</i> de outros patógenos intraeritrocitários ou partículas, em um esfregaço sanguíneo de felino (WANG et al., 2017).	38
Figura 9: Anéis de sinete, em destaque nas setas, observados à microscopia óptica (PANAIT et al., 2020).	39
Figura 10: Diagnóstico patológico de <i>Cytauxzoonose</i> aguda. Cauda de esfregaço sanguíneo com monócito parasitado por esquizontes (WIKANDER; KANG; REIF, 2020).	39
Figura 11: Corte histológico de pulmão com esquizontes aderidos ao endotélio (pontas de flechas abertas) dentro de um vaso (WIKANDER; KANG; REIF, 2020).	40
Figura 12: Classificação taxonômica clássica dos piroplasmídeos encontrados em caninos.	44
Figura 13: Patogenicidade comparada das principais <i>Babesia</i> spp que acometem cães domésticos.	59

Figura 14: Ciclo de vida de Babesia spp.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 15: Representação esquemática dos eventos responsáveis pela persistência de Babesia canis em seu hospedeiro.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Cão infectado por Rangelia vitalii apresentando mucosa pálida e sangramento em ponta de orelha. (FRANÇA et al., 2010).....	68
Figura 17: Algoritmo para o diagnóstico da Babesiose canina (Adaptado de Solano-Gallego et al, 2016).	69
Figura 18: <i>Rangelia vitalii</i> encontrada em esfregaços sanguíneos de cães infectados. Formas individuais dentro de hemácias (a-c), neutrófilos (d), monócitos (e) e múltiplas formas dentro de neutrófilos. (SOARES et al, 2011).	70

Lista de Quadros

Quadro 1: Parasitas do gênero Babesia encontrados em pequenos animais, incluindo suas designações comuns, filogenia molecular, taxonomia clássica, e as doenças causadas por esses agentes. Em vermelho, classificação para as Babesias. (Adaptado de JALOVECKA et al., 2019).	16
Quadro 2: Parasitas do gênero Theileria e Cytauxzoon encontrados em pequenos animais, incluindo suas designações comuns, filogenia molecular, taxonomia clássica, e as doenças causadas por esses agentes. Em azul, classificação para as Theilerias; em verde, classificação para Cytauxzoon. (Adaptado de JALOVECKA et al., 2019).	17
Quadro 3: Distribuição geográfica de Theileria spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	19
Quadro 4: Distribuição de Babesia spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	20
Quadro 5: Distribuição geográfica de Cytauxzoon spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	24
Quadro 6: Características morfológicas das espécies de Babesia que infectam gatos domésticos. Fontes: (AYOOB; PRITTIE; HACKNER, 2010; BOSMAN et al., 2010; LEMPEREUR et al., 2017; BANETH et al., 2019; BOSMAN et al., 2019).	36
Quadro 7: Distribuição de Theileria spp em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	46

Quadro 8: Distribuição de Babesia spp em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	48
Quadro 9: Distribuição de Rangelia vitalii em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.	56
Quadro 10: Espécies das grandes e pequenas Babesias atualmente identificadas em cães, com seus correspondentes vetores. (Adaptado de Bilić et al., 2018; BANETH et al., 2020).	Erro! Indicador não definido.
Quadro 11: Caracterização morfológica à microscopia óptica das principais Babesias causadoras de enfermidades em cães domésticos.	69

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Piroplasmídeos são hemoprotozoários muito frequentes na clínica de pequenos animais do Brasil (Dantas-Torres, F.; Figueiredo, 2006). Recebem essa designação devido ao formato de pera que adquirem ao se multiplicarem (Uilenberg, 2006). São classificados como Piroplasmídeos de canídeos os protozoários dos gêneros *Babesia* spp, *Theileria* spp (Schnittger et al, 2012) e *Rangelia vitalii* (Soares et al, 2011). Já para felídeos estão descritos os gêneros *Babesia* spp, *Cytauxzoon* spp. e *Theileria* spp. (Alvarado-Rybak et al., 2016). Os piroplasmas pertencem ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma e ordem Piroplasmídeos (Solano-Gallego; Baneth, 2011).

Atualmente, a classificação em geral de Piroplasmídeos não é mais baseada apenas na análise morfológica desses parasitas, visto que a caracterização molecular e o posicionamento filogenético desses agentes têm reclassificado geneticamente a relação entre eles (Schreeg et al., 2016b; Schnittger, 2018; Jalovecka et al., 2019). Dessa forma, as Babesias não são mais divididas em dois grupos de acordo com seu tamanho: grande ou pequena (Boozer; Macintire, 2003). Além disso, *Babesia canis*, *Babesia rossi* e *Babesia vogeli* não são mais consideradas subespécies, mas sim espécies distintas (Zahler et al, 1998; Carret et al, 1999). Já as pequenas Babesias descritas atualmente compreendem a *Babesia gibsoni* (Solano-Gallego and Baneth, 2011), *Babesia conradae* (Kjemtrup et al., 2006) e *Babesia vulpes* (Baneth et al., 2019). Além dessas, há a Babesia grande não classificada (Birkenheuer et al., 2004) e, recentemente, a identificação de uma Babesia de tamanho intermediário, *Babesia negevi* (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021). Quanto às Theilerias, diversas espécies já foram descritas tanto para o cão (Criado et al., 2006; Inácio et al., 2019; Salim et al., 2019; Díaz-Regañón et al., 2020; Habibi et al., 2020; Sili et al., 2021) quanto para o gato (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021), apesar do significado clínico desses patógenos não ter sido esclarecido para nenhuma das espécies. *Rangelia vitalii* representa uma única espécie do gênero (Soares et al, 2011), enquanto *Cytauxzoon* spp. engloba seis espécies definidas, quais sejam: *Cytauxzoon felis*, *Cytauxzoon* sp., *Cytauxzoon manul* (Wang et al., 2017), *Cytauxzoon banethi*, *Cytauxzoon otrantorum*, e *Cytauxzoon europaeus* (Panait et al., 2021).

No Brasil, no que diz respeito a cães domésticos, *Babesia vogeli* é considerada endêmica (Maggi and Krämer, 2019), enquanto *Rangelia vitalii* é encontrada apenas no sul (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021) e sudeste (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021) do país. Entretanto, em análise microscópica, *Rangelia vitalii* poderia estar sendo subdiagnosticada como *Babesia* spp, devido à grande semelhança entre elas em esfregaços sanguíneos (Lopes et al., 2014). Além disso, o agente já foi reportado em uma cidade do Paraguai, onde aparentemente não foi identificado *Amblyomma aureolatum*, único carrapato reconhecido com capacidade vetorial (Inácio et al., 2019), assim como DNA de *Rangelia vitalii* já foi identificado em ninfas de *Amblyomma sculptum*, ácaro não relacionado à transmissão do piroplasmídeo (Soares et al., 2018). Dessa forma, mesmo regiões onde aparentemente não há a presença de *A. aureolatum*, não podem deixar de ser investigadas quanto à ocorrência desse piroplasmídeo. Quanto à *Theileria* spp., até o momento o único relato na América Latina foi no Chile (Sacristán et al., 2019). Com relação a felinos, apesar de já terem sido descritas espécies dos três gêneros de piroplasmídeos no país (*Babesia* spp, *Cytauxzoon* sp. e *Theileria* spp.; Baneth et al., 2020; Far et al., 2021), esses relatos são escassos, e dados clínicos e laboratoriais são ainda mais raros, tanto para cães quanto para gatos.

Além disso, a ocorrência desses piroplasmídeos na região do Distrito Federal não foi investigada até agora, bem como a caracterização clínico-patológica para ambas as espécies é incipiente. Dessa forma, com o objetivo de investigar a ocorrência de piroplasmídeos em cães e gatos domésticos do Distrito Federal, assim como caracterizar esses agentes quanto à sua relevância clínica, o presente estudo buscou realizar a avaliação hematológica, bioquímica e molecular desses hemoprotozoários.

REVISÃO DE LITERATURA

Parte 1: Piroplasmas em felinos domésticos

Piroplasmas estão entre os mais importantes agentes transmitidos por carrapatos para animais domésticos e selvagens do mundo todo (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021). Parasitas dessa ordem receberam essa designação devido ao formato piriforme que alguns agentes adquirem ao parasitar hemácias do hospedeiro (Mehlhorn and Schein, 1993). Atualmente, a classificação dos piroplasmídeos não é mais baseada apenas em sua morfologia

e vetores envolvidos, já que técnicas moleculares e análises filogenéticas têm ajudado a elucidar melhor a relação entre esses agentes (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021). Em felídeos os piroplasmídeos compreendem os gêneros *Cytauxzoon* spp, *Theileria* spp e *Babesia* spp (Alvarado-Rybak et al., 2016).

1.1. Taxonomia dos piroplasmídeos em felinos

Piroplasmídeos de felídeos estão classificados no Filo Apicomplexa, Ordem Piroplasmorida, Classe Piroplasma e Família Theileriidae (*Cytauxzoon* spp e *Theileria* spp) ou Babesiidae (*Babesia* spp; Baneth et al., 2020; Far et al., 2021) Figura 1.

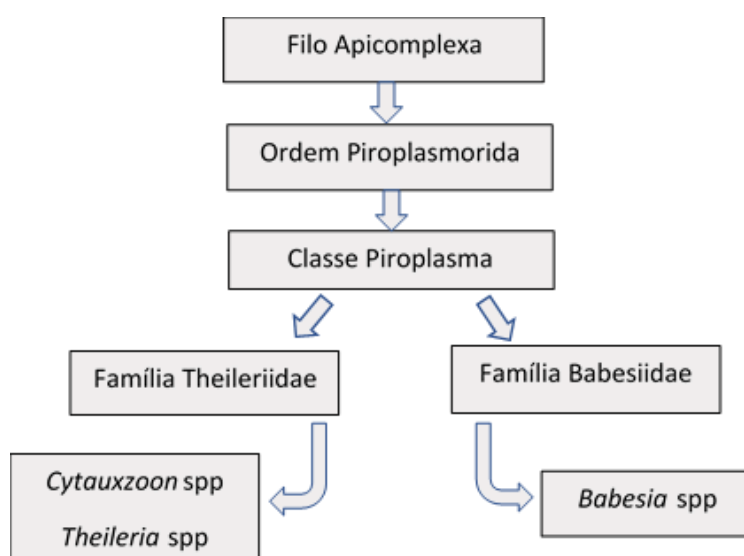


Figura 1: Classificação taxonômica clássica dos piroplasmídeos encontrados em felinos.

A alta especificidade que as ferramentas da biologia molecular apresentam tem sido amplamente explorada nos trabalhos mais recentes de caracterização molecular e posicionamento filogenético desses parasitas (Baneth et al., 2020; Far et al., 2021). Entretanto, a análise genética isolada de uma sequência de um gene pode levar a equívocos, dependendo do gene e tamanho do fragmento analisado, visto que particularidades fenotípicas de cada agente muitas vezes não acompanham variações na sua sequência gênica (Uilenberg et al., 2018). Como exemplo, características peculiares que definem um gênero, como a transmissão transovariana e a infecção exclusivamente de hemácias pelo parasita, típicas das Babesias, não se aplicam a todas as espécies do gênero, como é o caso do grupo da *Babesia microti* (Uilenberg, 2006). Considerando essas exceções, a classificação mais recente e utilizada atualmente é a descrita por Jalovecka et al., 2019, em que os autores, utilizando sequências do gene 18SrRNA, definiram os grupos de piroplasmídeos em clados, de

acordo com sua análise filogenética, mas também considerando o ciclo biológico da Ordem Piroplasmorida (Figura 2).

Considerando a classificação de clados para as espécies já descritas em pequenos animais, as Babesias estão definidas nos clados I, III e X; as Theilerias nos clados IV, VIII e IX; já o *Cytauxzoon*, no clado VII (Quadros 1 e 2):

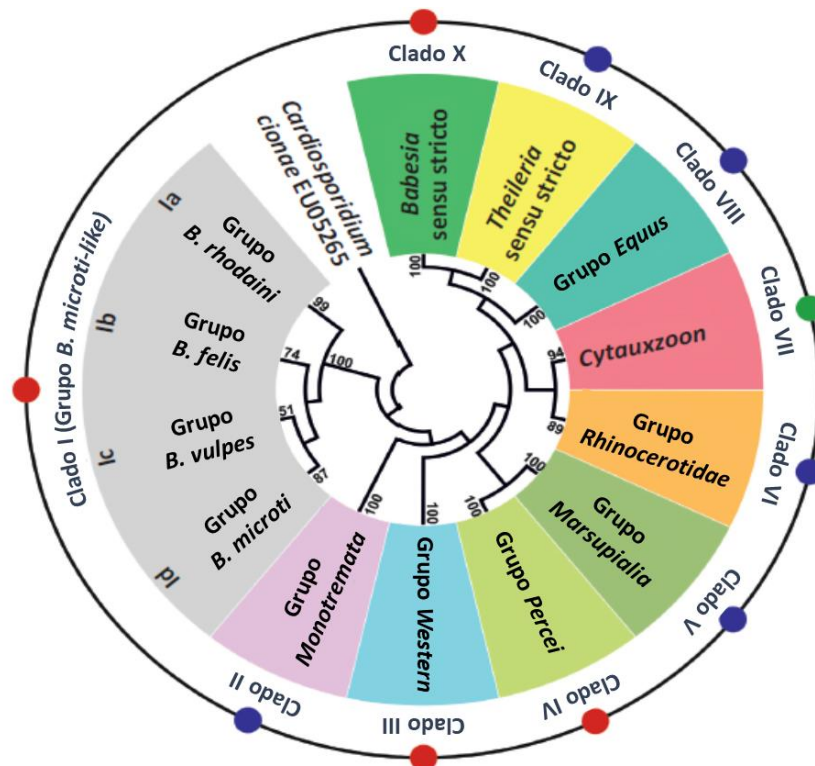


Figura 2: Árvore filogenética de Piroplasmídeos utilizando sequências do gene 18S rRNA de es de Cytauxzoon, Babesia e Theileria. Em pontos vermelhos, os clados que compreendem os asmiédeos referidos como Babesia; em azul, os piroplasmídeos referidos como Theileria; em os piroplasmídeos referidos como Cytauxzoon. (Jalovecka et al., 2019).

Quadro 1: Parasitas do gênero *Babesia* encontrados em pequenos animais, incluindo suas designações comuns, filogenia molecular, taxonomia clássica, e as doenças causadas por esses agentes. Em vermelho, classificação para as Babesias. (Adaptado de JALOVECKA et al., 2019).

Designação comum		Filogenética		Classe taxonômica	Hospedeiros vertebrados	Espécies referência	Doenças
Babesia		Clado	Subclado				
Clado <i>B. microti</i>	Grupo <i>B. microti</i>	I	Ia	<i>Babesia</i> sensu lato	Rodentia, humanos	<i>B. microti</i>	Babesiose humana
	Grupo <i>B. vulpes</i>		Ib		Macaca	<i>B. vulpes</i>	Babesiose canina
	<i>B. rhodaini</i>		Ic		Canidae, Mustelidae	<i>B. rhodaini</i>	Desconhecida
	<i>B. felis</i>		Id		Rodentia	<i>B. felis</i>	Desconhecida
Clado Western (ocidental)		III	<i>Babesia</i> sensu lato	Bovidae, Cervidae, Canidae, Felidae, Herpestidae, Canidae (humano)	<i>B. duncani</i> <i>B. lengau</i> <i>B. conradae</i>	Babesiose humana Babesiose canina	
Clado Babesia sensu strictu (Babesia verdadeira)		X	<i>Babesia</i> sensu strictu	Marsupialia, Bovidae, Cervidae, Giraffidae, Rodentia, Canidae, Mustelidae, Ursidae, Felidae, Aves, humanos	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. canis</i> <i>B. ovis</i>	Babesiose bovina Babesiose ovina Babesiose canina Babesiose humana	

Quadro 2: Parasitas do gênero *Theileria* e *Cytauxzoon* encontrados em pequenos animais, incluindo suas designações comuns, filogenia molecular, taxonomia clássica, e as doenças causadas por esses agentes. Em azul, classificação para as Theilerias; em verde, classificação para *Cytauxzoon*. (Adaptado de Jalovecka et al., 2019).

Designação comum	Filogenética	Classe taxonômica	Hospedeiros vertebrados	Espécies referência	Doenças
Theileria	Clado				
Grupo marsupialia	IV	<i>Theileria</i> sensu lato	Marsupialia	<i>Theileria</i> spp	Desconhecida
Grupo Equus	VIII	<i>Theileria</i> sensu lato	Equidae	<i>T. equi</i> <i>T. haneyi</i>	Babesiose equina
<i>Theileria</i> sensu strictu (<i>Theileria</i> verdadeira)	IX	<i>Theileria</i> sensu strictu	Bovidae, Cervidae	<i>T. annulata</i> <i>T. parva</i> <i>T. lestoquardi</i> <i>T. orientalis</i>	Theileriose tropical Febre da Costa Leste Theileriose oriental
Cytauxzoon	VII	<i>Cytauxzoon</i>	Felidae, Ursidae, Herpestidae	<i>C. felis</i> <i>C. manuls</i>	Cytauxzoonose felina

1.2. Agentes etiológicos

A Babesiose felina pode ser causada por diversas espécies. Algumas delas, por exemplo a *Babesia vogeli*, aparenta ser a mesma espécie associada a caninos (Penzhorn and Oosthuizen, 2020). Da mesma forma, *Babesia canis*, outro agente frequente em cães da Europa, além de *Babesia vulpes*, também podem infectar felinos domésticos (Criado-Fornelio et al., 2003b). Outras espécies originalmente descritas em hospedeiros não felinos, com posterior identificação em gatos domésticos, são a *Babesia gibsoni*, relatada no Caribe (Kelly et al., 2017) e *Babesia bigemina*, identificada no Mato Grosso do Sul, Brasil (André et al., 2015).

Já espécies primariamente descritas em felídeos incluem a *Babesia felis* (Bosman et al., 2007; Alho et al., 2017; Salim et al., 2018; Bosman et al., 2019), *Babesia leo* (Bosman et al., 2007; Bosman et al., 2019), *Babesia* sp cat Western Cape (Bosman et al., 2019) e *Babesia lengau* (Bosman et al., 2010; Bosman et al., 2013), todas de origem africana e causadoras de sinais clínicos variáveis nos gatos domésticos infectados (Penzhorn and Oosthuizen, 2020).

Ainda há relatos de *Babesia microti* em felinos domésticos na Itália (Spada et al., 2014), Paquistão (Akram et al., 2019) e África do Sul (Bosman et al., 2019), com alguns animais infectados apresentando sinais brandos. Similarmente, *Babesia hongkongensis*, com alguns relatos de casos na Ásia, mostrou-se assintomática para seus hospedeiros felinos (Wong et al., 2012; Wang et al., 2020). Por fim, em dois gatos domésticos de Israel foram identificados piroplasmídeos denominados *Babesia canis* subespécie *presentii*. Um dos animais apresentava cistite, aparentemente não relacionada à infecção pelo agente, e o segundo animal, apesar das alterações hematológicas e presença de sinais clínicos, também era positivo para hemoplasmosose e para o vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), o que prejudica a ligação direta do protozoário com as manifestações clínicas nesses felinos (Baneth et al., 2004). Outras espécies de *Babesia* spp. de felídeos selvagens, como *Babesia herpali* e *Babesia pantherae*, identificadas em leões, guepardos e panteras da Florida (Yabsley, M.J., Murphy, S.M, 2006), ainda não têm esclarecidas a infectividade e patogenicidade para gatos domésticos suscetíveis (Hartmann et al., 2013).

1.3. Distribuição geográfica e prevalência

A prevalência de piroplasmídeos em gatos domésticos pelo mundo varia de acordo com o gênero envolvido. No Brasil há relatos dos três gêneros (Maia et al., 2013; André et al., 2014; André et al., 2015; Malheiros et al., 2016; André et al., 2017; Pedrassani et al., 2019).

Dados sobre o gênero *Theileria* em felinos são escassos. Apenas três relatos de *Theileria* spp em gatos domésticos foram observados em todo o mundo até o momento, todos oriundos da América do Sul (André et al., 2014; André et al., 2015; Sacristán et al., 2019). Dois deles foram descritos no Brasil, nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, com prevalências de 3% e 5,96%, respectivamente (André et al., 2014; André et al., 2015). A espécie mais relatada nesses trabalhos é a *Theileria equi* (André et al., 2014; Sacristán et al., 2019), mas *Theileria* sp e *T. cervi* também foram encontradas, o que avança a hipótese da presença de novos genótipos de piroplasmídeos circulantes em gatos, os quais seriam filogeneticamente relacionados aos agentes encontrados em ruminantes selvagens e domésticos (André et al., 2015). Contudo, em todos os estudos foi analisada apenas a prevalência molecular, portanto a caracterização clínica e laboratorial, e por conseguinte a patogenicidade da infecção em gatos domésticos ainda não é conhecida (André et al., 2014; André et al., 2015; Sacristán et al., 2019). A escassez de trabalhos sobre o agente em felinos também deve-se ao fato de que recentemente a espécie *Theileria annae* foi reclassificada como *Babesia vulpes* (Baneth et al., 2015; Baneth et al., 2019), então informações obtidas pelos trabalhos com relatos de *T. annae* caracterizam na verdade o protozoário do gênero *Babesia*. Mas é possível afirmar, no geral, que o gênero *Theileria* se distingue das Babesias por apresentar infecção de leucócitos por esporozoítos, maturação de esquizontes em merozoítos, e posterior infecção de hemácias para formar piroplasmas (Mans et al., 2015). O quadro 3 apresenta as espécies de *Theileria* que acometem gatos domésticos descritas no mundo.

Quadro 3: Distribuição geográfica de *Theileria* spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Chile	<i>Theileria equi</i>	3,3%	(Sacristán et al., 2019)
	Brasil - MS	<i>Theileria sp, Theileria cervi</i>	5,96%	(André et al., 2015)
	Brasil - SP	<i>Theileria equi</i>	3%	(André et al., 2014)

Já *Babesia* spp. têm sido descritas em gatos domésticos de quase todos os continentes, exceto Austrália e Antártica, porém, quando comparadas à Babesiose em outras espécies, ainda há poucas publicações sobre casos em felinos (Penzhorn and Oosthuizen, 2020). A primeira descrição de Babesiose felina data de 1904, acometendo felinos selvagens e domados na Índia, porém a publicação não detalha maiores informações sobre a caracterização do agente etiológico bem como sobre a doença causada (Lingard and Jennings, 1904). Nos anos seguintes, relatos de espécies morfológicamente nomeadas como *Babesia felis* foram descritas em países da África como Sudão e Cairo. Atualmente estão descritas mais de dez espécies de *Babesia* spp pelo mundo que acometem felinos domésticos (Penzhorn and Oosthuizen, 2020), com prevalência molecular do gênero variando de 0,8% na Itália (Spada et al., 2014) a 39,5% na Tailândia (Do et al., 2021). O quadro 4 resume a distribuição geográfica mundial e a prevalência baseada no diagnóstico molecular de *Babesia* spp relatada em gatos domésticos.

Quadro 4: Distribuição de *Babesia* spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Caribe	<i>Babesia gibsoni</i>	4%	(Kelly et al., 2017)
		<i>Babesia vogeli</i>	13%	
		<i>Babesia sp</i>	1%	
	Brasil - RS	<i>Babesia vogeli</i>	4%	(Malheiros et al., 2016)
	Brasil - MS	<i>Babesia vogeli</i>	5,29%	(André et al., 2015)

	Brasil - MS	<i>Babesia bigemina</i>	0,66	
	Brasil - SP	<i>Babesia vogeli</i>	16%	(André et al., 2014)
	Trinidad e Tobago	<i>Babesia vogeli</i>	6,7%	(Georges et al., 2008)
Ásia	Qatar	<i>Babesia vogeli</i>	2,9%*	(Alho et al., 2017)
	Paquistão	<i>Babesia felis</i>	11%	(Salim et al., 2018)
	Israel	<i>Babesia canis presentii</i>	2 RC**	(Baneth et al., 2004)
	China	<i>Babesia hongkongensis</i>	1 RC	(Wong et al., 2012)
	China	<i>Babesia hongkongensis</i>	8%	(Wang et al., 2020)
	Tailândia	<i>Babesia vogeli</i>	1,4%	(Simking et al., 2010)
	Tailândia	<i>Babesia spp</i>	39,5%	(Do et al., 2021)
	Paquistão	<i>Babesia microti</i>	13,2%	(Akram et al., 2019)
África	África do Sul	<i>Babesia lengau</i>	2RC**	(Bosman et al., 2013)
	África do Sul	<i>Babesia sp. Cat Western Cape</i>	7/18***	(Bosman et al., 2019)
		<i>Babesia leo</i>	5/18***	
		<i>Babesia microti</i>	1/18***	
	África do Sul	<i>Babesia felis</i>	33,33%***	(Bosman et al., 2007)
		<i>Babesia leo</i>	3,44%***	
<i>Babesia spp</i>		18,51%***		
Europa	Portugal e Espanha	<i>Babesia canis</i>	18,75%	(Criado-Fornelio et al., 2003b)
		<i>Babesia vulpes</i>	12,5%	
	Portugal	<i>Babesia canis</i>	1,3%	(Vilhena et al., 2013)
		<i>Babesia vogeli</i>	8,1%	
	Portugal	<i>Babesia vogeli</i>	6,9%	(Maia et al., 2014)
	Itália	<i>Babesia microti</i>	0,8%	(Spada et al., 2014)

Legenda: *1 caso de *Babesia felis* de animal oriundo da África; **RC: relato de caso; ***critérios de inclusão no estudo: sinais, identificação de piroplasmas em esfregaços sanguíneos e/ resultado positivo em Reverse Line Blot (RLB) Hybridization.

A Cytauxzoonose felina é causada pelo piroplasmídeo do gênero *Cytauxzoon*. Sua primeira descrição foi em 1976 no Missouri, EUA. Na ocasião foram relatados quatro casos fatais de felinos domésticos (Wagner, 1976). Nas décadas seguintes a infecção era observada apenas em felídeos, contudo recentemente foram relatados casos em suricatos, (*Suricata suricata*) na África do Sul, (Leclaire et al., 2015) e em um filhote de urso marrom, (*Ursus arctos yesoensis*) no Japão (Jinnai et al., 2010).

A Cytauxzoonose é conhecida por ser uma grave doença em gatos domésticos do sul e sudeste dos Estados Unidos (Meinkoth and Kocan, 2005; Brown et al., 2009; Lloret et al., 2015; Rizzi et al., 2015), ocorrendo em mais de um terço dos estados desse país (Sherrill and Cohn, 2015) (Figura 3).

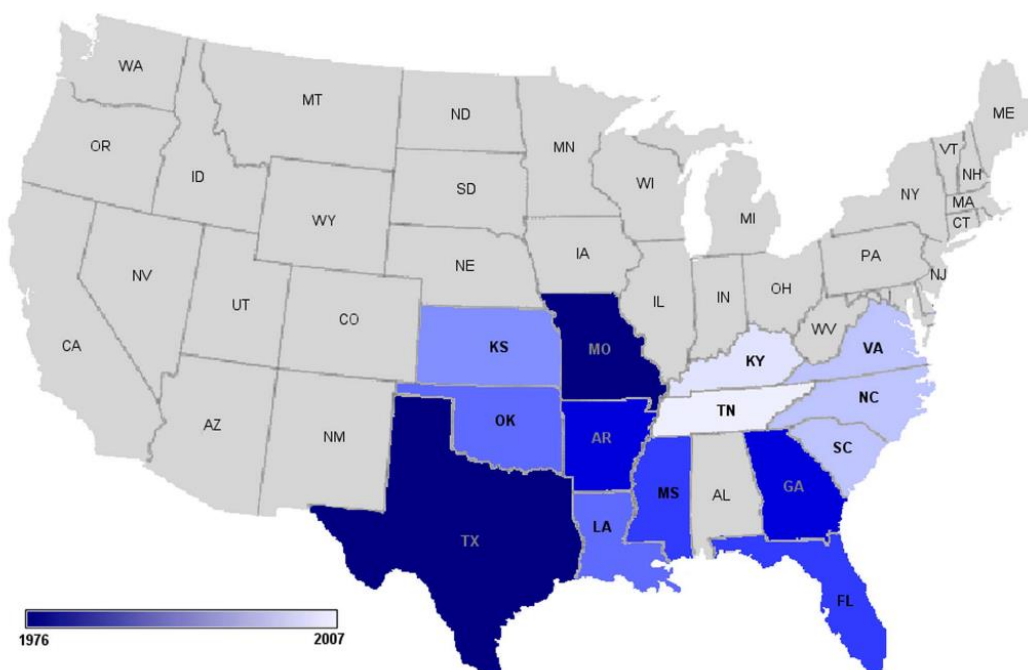


Figura 3: Distribuição da Cytauxzoonose nos Estados Unidos. Fonte: (Tarigo et al., 2013).

A prevalência molecular da infecção pelo *Cytauxzoon* sp em gatos domésticos pelo mundo varia de 0,3% (Haber et al., 2007) a 30,3% (Brown et al., 2010), com ambos os relatos sendo de animais assintomáticos oriundos de regiões endêmicas dos Estados Unidos para a doença. Já a infecção no principal reservatório natural da doença nos EUA, o linco-pardo-

pardo (*Lynx rufus*), apresenta alta prevalência, atingindo valores de até 79% em animais de vida livre do estado de Missouri (Shock et al., 2011).

Atualmente estão caracterizadas cinco espécies de *Cytauxzoon* em felídeos: a primeira, *C. manul*, já foi relatada em gatos selvagens na Mongólia, Ásia (Ketz-Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005); na Espanha, Europa (Luaces et al., 2005); e ainda em um leão na África (Kelly et al., 2014). A segunda, *C. felis*, é amplamente disseminada em gatos domésticos e selvagens na região leste dos EUA (Qurollo, 2019), além de haver um único relato na Alemanha, em um tigre (Jakob and Wesemeier, 1996), e um relato recente em gatos domésticos da China (Zou et al., 2019). Algumas publicações na Europa e Ásia reivindicam a identidade de *C. felis*, entretanto esses trabalhos não efetuaram análise molecular completa, como por exemplo o sequenciamento gênico para confirmação do agente (Zaemi et al., 2015; Moghaddam et al., 2020). No Brasil também há relatos de *Cytauxzoon* geneticamente mais similar a *C. felis* em gatos domésticos nas regiões sul (Pedrassani et al., 2019) , sudeste (Maia et al., 2013), centro-oeste (André et al., 2015) e nordeste (André et al., 2017). Com relação aos felinos selvagens brasileiros, *C. felis* já foi identificado em jaguatiricas (Filoni et al., 2012; de Sousa et al., 2018; André et al., 2009), onça-pintada (André et al., 2009; Furtado et al., 2017), onça parda (André et al., 2009) e leão, causando, nesse último caso, doença fatal (Peixoto et al., 2007).

Ainda com relação aos felídeos selvagens, recentemente foram descritas três novas espécies na Europa: *Cytauxzoon europaeus*, *Cytauxzoon otrantorum* e *Cytauxzoon banethi* (Panait et al., 2021). Ademais, espécies ainda não completamente definidas, conhecidas como *Cytauxzoon* sp, são descritas na África, Ásia e principalmente na Europa (Barandika et al., 2016; Wang et al., 2017). Recentemente um isolado na Índia obtido de amostras de três gatos domésticos da região mostrou apenas 92% de identidade com o *C. felis*, além de ser classificado em um clado diferente e também não ser amplificado por oligonucleotídeos específicos para a espécie americana. Apesar do fragmento do gene analisado ser pequeno (284pb), todos os outros indícios sugerem a possibilidade de se tratar de uma sexta nova espécie de *Cytauxzoon* (Traversa et al., 2021). O Quadro 5 resume a distribuição geográfica mundial de *Cytauxzoon* sp relatadas atualmente, com base no seu diagnóstico molecular.

Quadro 5: Distribuição geográfica de *Cytauxzoon* spp em gatos domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Estados Unidos	<i>C. felis</i>	30,3%	(Brown et al., 2010)
			6,2%	(Rizzi et al., 2015)
			0,3%	(Haber et al., 2007)
	Brasil - SP	<i>C. felis</i>	2 RC*	(André et al., 2017)
	Brasil - RJ	<i>C. felis</i>	1 RC*	(Maia et al., 2013)
	Brasil - RS	<i>C. felis</i>	3,33%	(Pedrassani et al., 2019)
	Brasil - MS	<i>C. felis</i>	0,66%	(André et al., 2015)
Ásia	Índia	<i>Cytauxzoon</i> spp	2,70%	(Traversa et al., 2021)
	Irã	<i>C. felis</i> **	19%	(Moghaddam et al., 2020)
	China	<i>C. felis</i>	21,5%	(Zou et al., 2019)
Europa	Portugal	<i>Cytauxzoon</i> sp	1 RC*	(Alho et al., 2016)
	Espanha	<i>Cytauxzoon</i> sp	1,2%	(Díaz-Regañón et al., 2017)
	França	<i>Cytauxzoon</i> sp	0,8%	(Legroux et al., 2017)
	Itália	<i>Cytauxzoon</i> sp	22,9%	(CARLI et al., 2012)
	Suíça	<i>Cytauxzoon</i> sp	4 RC*	(Nentwig et al., 2018)
	Alemanha	<i>Cytauxzoon</i> sp	1 RC*	(Panait et al., 2020)

*RC: relato de caso; **diagnóstico questionável – sequenciamento não realizado.

1.4. Patogenicidade

A patogenicidade da Babesiose felina está ligada principalmente à espécie envolvida. Dessa forma, as espécies consideradas mais patogênicas são aquelas encontradas na África - *B. felis*, *B. leo*, *B. lengau*, mas gatos domésticos infectados por *B. microti* podem também manifestar sinais brandos da doença (Penzhorn, Oosthuizen, 2020). Por outro lado, acredita-se que também possa haver infecção assintomática por *B. felis*, especialmente em regiões endêmicas para a doença (Ayoob et al., 2010), apesar de essa informação ser baseada em estudos antigos, quando não era utilizada a biologia molecular como ferramenta diagnóstica. Relatos das demais *Babesia* spp mostram animais infectados assintomáticos até

o momento, porém a infectividade e patogenicidade ainda não são completamente conhecidas (Yabsley, M.J.; Murphy, S.M, 2006; Do et al., 2021).

Da mesma forma, a patogenicidade da Cytauxzoonose ainda não está completamente elucidada, porém parece estar relacionada principalmente ao tipo de agente envolvido. Classicamente a infecção por *C. felis* é considerada altamente patogênica e fatal (Lloret et al., 2015; Sherrill and Cohn, 2015), enquanto *C. manul* e *Cytauxzoon* sp estão relacionados a casos assintomáticos (Carli et al., 2012; Díaz-Regañón et al., 2017) ou brandos (Carli et al., 2014). Entretanto, há relatos de gatos domésticos assintomáticos (Meinkoth et al., 2000) e também animais sobreviventes à infecção por *C. felis*, mesmo não tendo recebido tratamento específico contra o agente (Meinkoth et al., 2000; Birkenheuer et al., 2006a). Hipóteses para esses casos incluem: diferentes graus de imunidade ao *C. felis*,; rotas atípicas de infecção, como ingestão de carrapatos ou hospedeiros infectados com o piroplasmídeo, resultando em baixa parasitemia; aumento da detecção de animais carreadores previamente não reconhecidos; ou infecção por uma cepa menos virulenta de *C. felis* ou por um organismo similar a ele (Meinkoth et al., 2000). E ainda, recentemente um estudo mostrando alta prevalência (25%) de gatos domésticos assintomáticos do Kansas, EUA, mas positivos à qPCR para *C. felis*, torna questionável a alta mortalidade da doença, ou ao menos sugere a existência de cepas de variadas virulências na região (Wikander et al., 2020a).

Já na Europa, relatos recentes de *Cytauxzoon* sp sugerem a associação da infecção desse agente a sinais clínicos de Cytauxzoonose, apesar de falharem em demonstrar a presença de esquizontes em macrófagos teciduais, principal fator relacionado à patogenicidade de *C. felis* (Legroux et al., 2017; Nentwig et al., 2018; Panait et al., 2020). Além disso, sinais atípicos para infecções causadas por *C. felis*, como por exemplo efusão abdominal (Alho et al., 2016), estomatite e neuropatias (Legroux et al., 2017) fazem desacreditar ou ao menos questionar que o agente causador seja de fato *Cytauxzoon* sp.

Tentativas no sentido de se identificar sequências gênicas que possam estar relacionados a maior ou a menor patogenicidade de *C. felis* já foram realizadas. Como exemplo, um estudo nos Estados Unidos que analisou os genótipos de gatos domésticos obtidos a partir da amplificação de ITS (Espaçador Interno Transcrito) mostrou que 79,2% dos animais infectados que apresentavam o genótipo ITSa sobreviveram, comparado com apenas 19% dos animais infectados com o genótipo ITSb (Brown et al., 2009a). Outro trabalho também correlacionou a predominância do genótipo ITSa com infecções não-fatais, o mesmo

tipo mais frequentemente encontrado no reservatório lince-pardo (Brown et al., 2009b). No entanto, em pesquisa posterior foi constatado que sequências ITS de gatos assintomáticos eram idênticas àquelas depositadas no GenBank provenientes de animais clinicamente doentes, o que sugeriu que as regiões ITS não sejam apropriadas para se avaliar especificamente a patogenicidade do *C. felis* (Brown et al., 2010). Além disso, nenhuma dessas sequências foi relacionada a genes virulentos ou qualquer proteína potencial envolvida na patogenicidade, ainda que sejam úteis para o estudo da sua variabilidade genética (Shock et al., 2012; Pollard et al., 2017).

Recentemente, Tarigo et al (2019) tentaram identificar outra região gênica que pudesse apresentar polimorfismos associáveis à apresentação clínica (sobrevivência versus mortalidade). Analisando o gene *ama1*, relacionado ao antígeno da membrana apical do parasita, concluíram, inesperadamente, que a região se apresenta muito conservada, limitando o uso desse gene como um marcador genético associado a patogenicidade (Tarigo et al., 2019).

Atualmente, a relação entre diferenças nas cepas e isolados com a virulência de cada agente ainda permanece amplamente inexplorada (Wikander et al., 2020a).

1.5. Condições predisponentes e associações

Considerando a espécie patogênica mais importante de *Babesia* spp, a *B. felis*, não é descrita nenhuma predisposição sexual ou racial para a doença (Hartmann et al., 2013), apesar de animais da raça Siamês poderem estar sobrerrepresentados em relação aos de raça pura (Schoeman et al., 2001; Penzhorn et al., 2004). Em contrapartida, é relatada predisposição etária, sendo a faixa de animais de até três anos de idade a mais acometida (Schoeman et al., 2001). Aparentemente há sazonalidade da doença, com maior ocorrência em épocas quentes do ano, o que corrobora com a provável transmissão por vetores carrapatos (Jacobson et al., 2000).

Infecções concomitantes pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Vírus da Imundeficiência Felina (FIV), e pelo *Mycoplasma haemofelis* são frequentemente encontradas em animais infectados por *B. felis*. Entretanto, não foi estabelecido se existe de fato uma associação entre a predisposição à doença ou o agravamento da enfermidade devido às coinfeções (Schoeman et al., 2001; Penzhorn et al., 2004; Ayoob et al., 2010).

No caso da Cytauxzoonose, existem condições predisponentes sazonais já conhecidas, como maior prevalência da doença no período de final da primavera ao início do outono (Birkenheuer et al., 2006a; Reichard et al., 2008; Wikander et al., 2020a), além de condições ambientais mais propícias, como locais arborizados (Reichard et al., 2008) e rurais (Raghavan et al., 2014). Tais observações são condizentes com o ambiente propício para seus carrapatos vetores. Outras condições que já foram associadas à doença são gênero e idade, sendo animais adultos e machos que têm acesso à rua os mais prevalentes em estudo retrospectivo (Birkenheuer et al., 2006a). Por outro lado, há alguns autores que acreditam não haver predisposição sexual, etária ou associação com infecções retrovirais (Lloret et al., 2015; Zou et al., 2019; Moghaddam et al., 2020).

1.6. Transmissão e ciclo biológico

Como até o momento não existem estudos controlados de transmissão de *Babesia* spp. em felídeos, assume-se que todas as espécies de *Babesia* spp. que ocorrem nesses animais sejam transmitidas por carrapatos. Os vetores para as espécies de *Babesia* spp que acometem felinos ainda não foram identificados (Hartmann et al., 2013), mas acredita-se que sejam os mesmos carrapatos relacionados à transmissão de *Babesia* spp. de outras espécies (Yabsley, M.J.; Murphy, S.M, 2006). Dessa forma, carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, e *Haemophysalis* são os vetores mais prováveis para o piroplasmídeo (Ayoob et al., 2010). Transfusões sanguíneas também são uma das formas possíveis de transmissão do agente (Hartmann et al., 2013).

Com relação à Cytauxzoonose, existe maior quantidade de estudos sobre o assunto. Trabalhos da década de 80 comprovaram experimentalmente que o carrapato *Dermacentor variabilis* atuou como vetor da Cytauxzoonose para a transmissão da doença, de lince-pardos para gatos domésticos. No entanto, atualmente os dados desses trabalhos vêm sendo questionados devido a importantes vieses, como a alta parasitemia do Lince-pardo receptor estudado - infestado com 400 carrapatos adultos (Blouin et al., 1987) e a utilização de animais esplenectomizados em experimento, ou seja, não imunocompetentes (Kocan, 1984).

Trabalhos posteriores demonstraram que apenas *Amblyomma americanum* participa da transmissão **natural** de *C. felis* em **gatos domésticos** (Bondy et al., 2005; Reichard et al., 2010; Allen et al., 2019), e somente em infecções experimentais controladas foi

observada a capacidade de vetor de *D. variabilis* (Kocan et al., 1992). Ademais, até o momento não foi observada a presença de DNA de *C. felis* em carrapatos *D. variabilis* que parasitavam gatos domésticos infectados (Bondy et al., 2005)(Little et al., 2018). Em estudo em que foi observada a detecção molecular de *C. felis* em *D. variabilis*, os únicos hospedeiros desses carrapatos eram guaxinins e uma marmota, animais que não apresentam, até o momento, relevância no ciclo de transmissão da Cytauxzoonose (Shock et al., 2014). Outrossim, a simples detecção de DNA do protozoário no possível vetor, *D. variabilis*, não indica necessariamente capacidade de transmissão do Cytauxzoon (Zieman et al., 2017). Ademais, em trabalhos em que foi testada a transmissão natural do *C. felis* entre gatos domésticos, somente o *A. americanum* mostrou-se competente para tal feito (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010; Allen et al., 2019). A figura 4 ilustra a proposição da infecção natural por *C. felis* baseada em dados experimentais. Notar que apenas o carrapato *Amblyomma americanum* está indicado como transmissor da doença entre gatos domésticos, a partir de suas ninfas e ácaros adultos. Já o papel de vetor de ácaros adultos de *Dermacentor variabilis* com relação aos lince-pardos está baseado somente nas infecções experimentais previamente comentadas e que utilizaram nos estudos alta parasitemia para infecção do hospedeiro (Blouin et al., 1987), além de animais receptores imunossuprimidos (Kocan, 1984). Contudo, a parasitemia mínima necessária para a transmissão de *C. felis* de um Lince-pardo infectado a um carrapato suscetível ainda não foi estabelecida (Zieman et al., 2020).

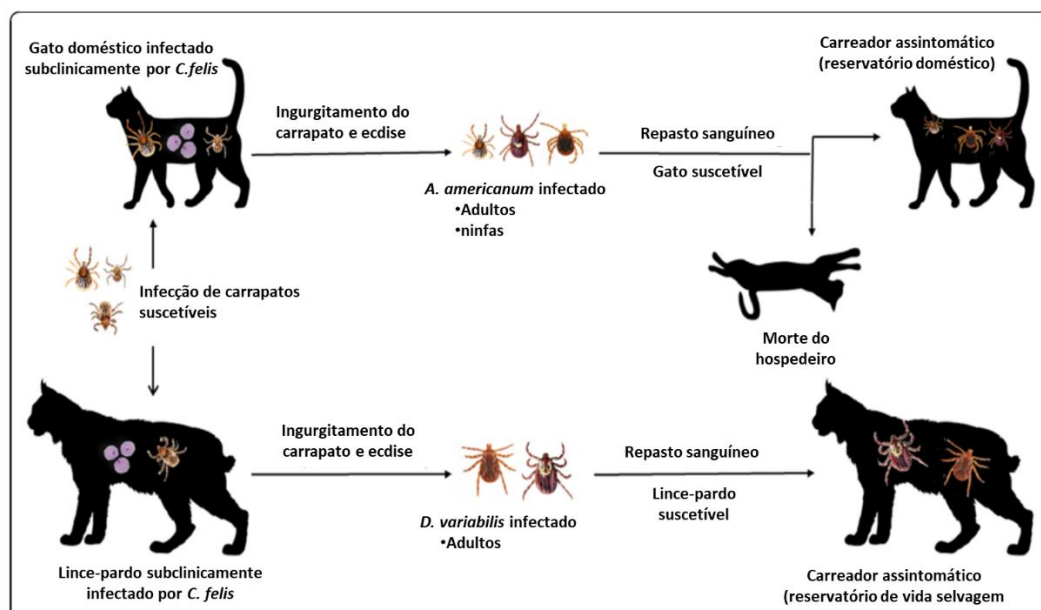


Figura 4: Ciclo de transmissão de *Cytauxzoon felis* baseado em dados experimentais (Adaptado de ALLEN et al., 2019).

De fato, a distribuição da Cytauxzoonose em gatos domésticos nos EUA parece estar melhor relacionada com a distribuição geográfica de *A. americanum* do que com a de *D. variabilis* (Birkenheuer et al., 2008; Reichard et al., 2010). Uma das hipóteses para que *A. americanum* seja considerado o vetor primário da doença e, portanto, mais eficiente na transmissão de *C. felis* em comparação ao *D. variabilis*, é a de que o primeiro necessita de menor carga parasitária do piroplasma para ser transmissível ao hospedeiro suscetível (Allen et al., 2019). Além disso, geralmente apenas estágios adultos de *D. variabilis* preferem se alimentar de felinos domésticos, enquanto no caso de *A. americanum* todos seus estágios de vida (larva, ninfa e adultos) têm predileção por grandes mamíferos como os felinos (Wikander et al., 2020b). Por fim, além da participação no ciclo de transmissão natural do felino doméstico, é provável também que *A. americanum* esteja envolvido no ciclo natural nos lince-pardos, pois a prevalência de *C. felis* nesses animais é baixa em locais onde a densidade desse carrapato é menor ou ausente (Shock et al., 2011). Poucos trabalhos comparam a detecção molecular de patógenos em carrapatos removidos de gatos com a identificação dos mesmos agentes no seu hospedeiro (Persichetti et al., 2016).

O felídeo silvestre lince-pardo atua como reservatório do piroplasma na América do Norte (Tarigo et al., 2013) e, ao contrário do que costuma ocorrer em gatos domésticos, geralmente apresenta somente infecção assintomática, justificada pelo ciclo parasitário relacionado à patogenicidade do agente - a esquizogonia - ser limitado nessa espécie (Blouin et al., 1987). Contudo, já foi descrito que lince-pardos podem ser infectados naturalmente e adoecerem de forma semelhante aos felinos domésticos (Nietfeld and Pollock, 2002). Outras espécies aventadas como prováveis reservatórios do *Cytauxzoon spp* são pumas do Texas (*Puma concolor stanleyana*) e da Flórida (*Puma concolor coryi*) (Yabsley, M.J.; Murphy, S. M., 2006), nos EUA; lince-pardo-ibérico, na Europa (Luaces et al., 2005), além de tigres não nativos da América do Norte, domiciliados em área endêmica para a doença (Lewis, K.M et al., 2012). O gato doméstico (*Felis catus*) também se mostrou efetivo em atuar como reservatório da doença, pois já foi observada sua capacidade de se manter parasitêmico mesmo sem desenvolver a Cytauxzoonose (Meinkoth et al., 2000; Haber et al., 2007; Brown et al., 2008).

Na América do Sul foi reportada prevalência de 13% de *C. felis* em animais assintomáticos como jaguatiricas, onças-pardas e onças pintada, o que sugeriu a possibilidade

de que no Brasil essas espécies possam servir como reservatórios do agente, visto também que linces-pardos não ocorrem no país (André et al., 2009)(Furtado et al., 2017). O carrapato envolvido na transmissão de *C. felis* ainda não foi determinado na América Latina entretanto, devido à maior frequência de carrapatos do gênero *Amblyomma* em animais selvagens (Labruna et al., 2002), acredita-se que esse ácaro possa desempenhar o papel de vetor (Furtado et al., 2017). Recentemente, um estudo mostrou forte associação entre jaguatiricas e *Cytauxzoon*, ratificando a hipótese de que o felídeo selvagem seja reservatório para o piroplasmídeo. O mesmo estudo também sugere infecção por via oral, por meio da predação das jaguatiricas por pequenos mamíferos infectados pelo *Cytauxzoon* (Santos et al., 2021).

Com relação ao *Cytauxzoon* sp., a detecção molecular com alta prevalência do piroplasma no linco-pardo ibérico *Lynx pardinus* (Millaín et al., 2007) linco-pardo-euroasiático (*Lynx lynx*) e gato selvagem (*Felis silvestris*) (Gallusová et al., 2016) corroboram para que essas espécies sejam prováveis hospedeiros e reservatórios. Quanto ao carrapato vetor, há hipóteses principalmente de que o carrapato *Ixodes ricinus* esteja envolvido na transmissão do *Cytauxzoon* sp., justificada devido à sua alta prevalência em felídeos selvagens da Europa (Dumitrache et al., 2012).

Ao contrário da *Babesia* sensu strictu, e da mesma forma que na *Babesia* sensu lato e *Theileria*, a transmissão de *Cytauxzoon* spp. é estritamente transestadial (Jalovecka et al., 2019), através da ninfa ou ácaro adulto (Allen et al., 2019). Recentemente, a transfusão sanguínea acidental também foi evidenciada como possibilidade de infecção por *Cytauxzoon* sp. (Nentwig et al., 2018). Contudo a transmissão vertical não foi comprovada até o momento e, se ocorrer, é provável que seja incomum e provavelmente desempenhe pouco ou nenhum papel na disseminação da Cytauxzoonose para gatos domésticos (Lewis et al., 2012). Outra hipótese que não pôde ser comprovada é a de que a ingestão pelo gato doméstico de *A. americanum* adulto infectado por *C. felis* poderia ser uma rota alternativa de infecção (Thomas et al., 2018).

As espécies do grupo Piroplasmorida possuem um ciclo de vida característico que difere significativamente de outros parasitas apicomplexos. Um consenso descreve três fases consecutivas: 1) esquizogonia e merogonia – multiplicação assexuada em células sanguíneas do hospedeiro vertebrado; 2) gamogonia – reprodução sexuada dentro do intestino do carrapato, posteriormente seguida pela invasão de cinetos nos tecidos internos dos

carrapatos; e 3) esporogonia – proliferação assexuada nas glândulas salivares do carrapato, resultando na formação de esporozoítos (Jalovecka et al., 2018).

O ciclo de vida do *Cytauxzoon* spp é melhor compreendido com relação à espécie *C. felis*, seu hospedeiro natural, o Lince-pardo (*Lynx rufus*), e seus carrapatos vetores *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* (Tarigo et al., 2013). O ciclo biológico de *C. felis* inicia-se a partir da picada do carrapato vetor em um hospedeiro suscetível (felídeo doméstico ou selvagem). Entre 36 a 48 horas (Thomas et al., 2018) após o repasto sanguíneo, esporozoítos invadem os macrófagos do hospedeiro felino, promovendo a **esquizogonia** - reprodução assexuada intra-leucocitária caracterizada por múltiplas divisões celulares, formando uma célula sincicial multinucleada que originará os chamados esquizontes. Macrófagos parasitados pelos esquizontes obstruem pequenos vasos sanguíneos de vários órgãos, o que caracteriza a forma aguda da Cytauxzoonose. Esquizontes maduros também se rompem dos leucócitos parasitados liberando vários merozoítos, que por sua vez adentram eritrócitos, ocorrendo a **merogonia** – multiplicação assexuada por fissão binária de merozoítos dentro de hemácias de vertebrados. São esses merozoítos que podem ser visualizados dentro dos eritrócitos, durante a pesquisa em esfregaço sanguíneo à microscopia óptica de sangue de animal infectado. Após a morte dessas células hospedeiras, os merozoítos infectam novas hemácias, perpetuando o ciclo assexuado. Ao mesmo tempo, alguns merozoítos intraeritrocitários diferenciam-se em gametócitos, forma infectante para carrapatos vetores que, no caso de *Theileria* e *Cytauxzoon*, são morfologicamente distinguíveis em macro e microgametas. Após nova picada de um carrapato vetor a partir de um felídeo infectado, esses gametócitos, que são células haplóides, fundem-se para formar um zigoto diplóide no intestino médio do carrapato, caracterizando a **gamogonia** – reprodução sexuada que permite a recombinação de material genético entre gametas. Os zigotos amadurecem, através de meiose, em cinetos haplóides, que entram nas glândulas salivares do carrapato dando início à **esporogonia** – reprodução assexuada na glândula salivar do vetor. Nesse local os cinetos dos piroplasmas sofrem fissão múltipla para produzir numerosos esporozoítos, formas infectantes para um hospedeiro felídeo, fechando o ciclo. (Tarigo et al., 2013; Wang et al., 2017; Jalovecka et al., 2018; Jalovecka et al., 2019). Vide Figura 5.

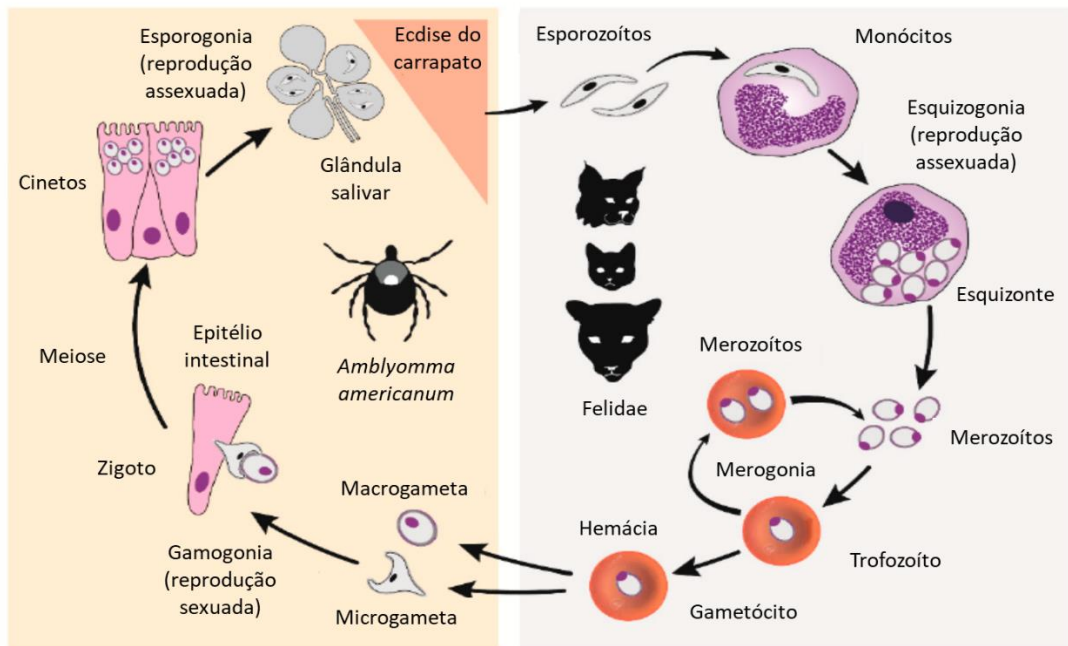


Figura 5: Ciclo de vida esquematizado de *Cytauxzoon felis* (Adaptado de Wikander; Kang; Reif, 2020).

Diferentemente, no gênero *Babesia* não ocorre a esquizogonia, ou seja, os esporozoítos infectantes, ao adentrarem a circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, invadem diretamente as suas hemácias, sem a infecção de leucócitos. Além disso, somente o grupo *Babesia sensu strictu* apresenta a transmissão transovariana, inexistente no grupo da *Babesia microti* (Jalovecka et al., 2018). Por fim, ao contrário do que ocorre no caso do *Cytauxzoon* e da *Theileria*, a diferenciação de gametas como micro e macrogametócito não ocorre em nenhum grupo de *Babesia spp* (Figura 6).

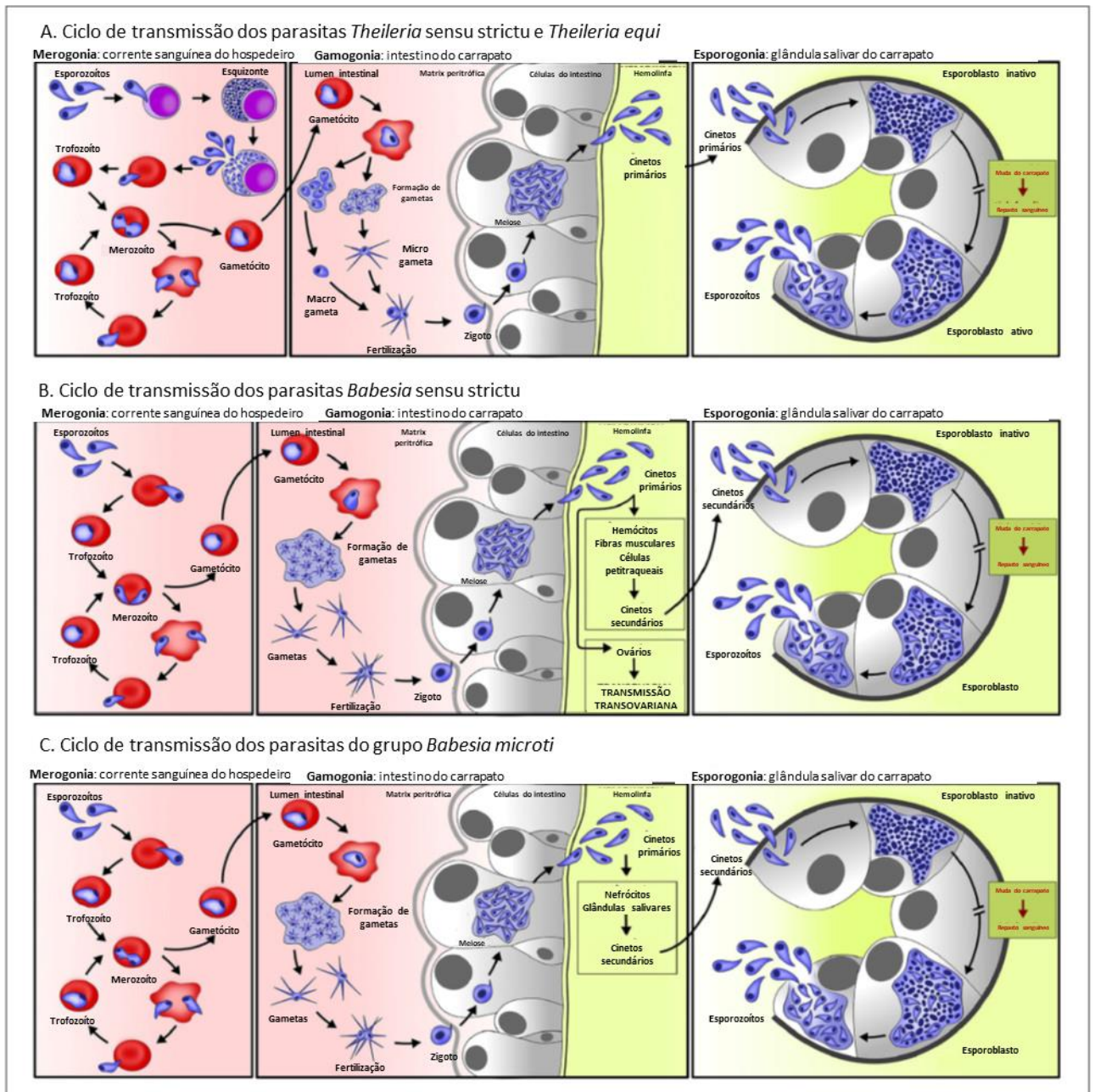


Figura 6: Comparação do ciclo de vida de piroplasmídeos. Em A, ciclo de *Theileria* spp; B, *Babesia sensu strictu*; C, grupo da *Babesia microti* (Adaptado de Jalovecka et al., 2018).

A Figura 7 compara as fases do ciclo biológico entre os piroplasmídeos, demonstrando: a presença de transmissão transovariana somente para o grupo *Babesia sensu strictu*, a presença de esquizogonia exclusivamente em parasitas dos gêneros *Theileria* e *Cytauxzoon*, bem como a diferenciação morfológica em micro e macrogametócitos existente somente nos gêneros *Theileria* e *Cytauxzoon* (Jalovecka et al., 2018).




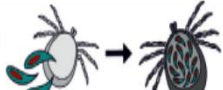
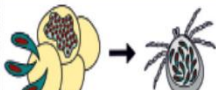



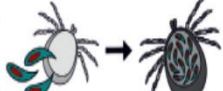




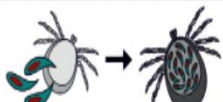
Piroplasmas	Esquizogonia	Merogonia	Gamogonia	Esporogonia	Transmissão transtestadial	Transmissão transovariana
<i>Babesia sensu stricto</i>	X					
<i>Babesia sensu lato</i>	X?					X
<i>Theileria</i> spp. <i>Cytauxzoon</i> spp.						X

Figura 7: Características morfológicas e de desenvolvimento de acordo com a taxonomia clássica dos piroplasmídeos. (Adaptado de Jalovecka et al., 2019).

1.7. Infecção, manifestações clínicas e achados histopatológicos

Doenças graves têm sido descritas em gatos domésticos infectados por *Babesia felis* na África do Sul, onde o agente é encontrado. Manifestações clínicas comuns incluem anorexia, letargia e fraqueza, além de anemia hemolítica, com hemólise intra e extravascular, semelhante à Babesiose canina. Entretanto, ao contrário da doença em cães, febre e icterícia são incomuns em felinos (Collett, 2000; Schoeman et al., 2001; Hartmann et al., 2013; Salim et al., 2018). Complicações da Babesiose incluem insuficiência renal, hepatopatia, edema pulmonar e sinais do Sistema Nervoso Central. Além disso, infecções concomitantes pelo *Mycoplasma haemofelis*, pelo vírus da Leucemia Felina (FeLV), ou pelo vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), podem agravar o quadro (Hartmann et al., 2013). Vale ressaltar, entretanto, que os trabalhos que mais caracterizam clinicamente a Babesiose causada por *B. felis* diagnosticavam o agente por meio da identificação do piroplasmídeo em esfregaços sanguíneos, o que não confirma precisamente sua identidade (Collett, 2000; Schoeman et al., 2001).

Apesar de assintomática para guepardos (Bosman et al., 2010), *Babesia lengau* mostrou-se patogênica para gatos domésticos, sendo causadora de grave anemia e icterícia, além da doença na forma cerebral. A infecção maciça dos capilares cerebrais, associada à congestão generalizada desse órgão, foram as lesões descritas em um dos dois casos descritos na literatura até o momento (Bosman et al., 2013).

Babesia leo também já se mostrou patogênica para gatos domésticos, os quais apresentaram letargia, anemia, icterícia e febre, em estudo recente (Bosman et al., 2019). Anteriormente a sua patogenicidade era questionável, pois só havia sido relatado um único caso, mas em associação com *B. felis*, espécie já amplamente conhecida como patogênica (Penzhorn, B.L.; Kjemtrup, A. M, 2001).

Aparentemente menos patogênica, *Babesia microti* foi relacionada a sinais inespecíficos como febre, palidez de mucosas (Akram et al., 2019), e linfonodomegalia (Spada et al., 2014). Apenas um caso relatado sugere infecção com sinais mais graves, semelhantes aos descritos para *B. leo* (Bosman et al., 2019).

Com relação ao *Cytauxzoon* sp., a resposta clínica de gatos domésticos com Cytauxzoonose em infecções experimentais depende do tipo e estágio da infecção. Assim, gatos domésticos inoculados com tecidos contendo esquizontes obtidos de outros gatos domésticos gravemente infectados, desenvolvem a forma fatal da doença. Da mesma forma, a inoculação de sangue periférico a partir também de gatos domésticos com quadro grave de Cytauxzoonose também induz curso clínico semelhante em outros gatos suscetíveis. Em contrapartida, a inoculação de sangue periférico de lince-pardos persistentemente infectados em gatos domésticos suscetíveis tipicamente resultou apenas em eritroparasitemia dos últimos, sem desenvolvimento de esquizontes ou sinais clínicos (Meinkoth; Kocan, 2005).

Recentemente, foi relatado o caso de um felino doméstico que ficou novamente doente com Cytauxzoonose sete anos após o primeiro episódio da doença. Apesar de no primeiro momento não ter havido confirmação molecular, o animal apresentou, no primeiro diagnóstico, sinais clássicos da doença, além de terem sido observados parasitas intraeritrocitários altamente compatíveis com *Cytauxzoon felis*. Os autores atribuem esse caso à infecção de uma nova cepa, configurando uma imunidade heteróloga, ou à possibilidade de imunidade primária não duradoura (Cohn et al., 2020).

Referente às manifestações clínicas, após 5 a 14 dias da infecção por *C. felis* em um gato doméstico podem ser observados febre, inapetência, fraqueza, letargia, êmese, icterícia, taquicardia, taquipneia, desidratação, dor generalizada, dispneia, linfonodomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, vocalização, protrusão da terceira pálpebra, estado mental alterado e equimoses (Collett, 2000; Schoeman et al., 2001). Icterícia, letargia, esplenomegalia e anorexia são os sinais mais comuns (Holman; Snowden, 2009). A obstrução vascular por

esquizontes é o principal mecanismo fisiopatológico que leva ao comprometimento circulatório, anemia hemolítica e disfunção de múltiplos órgãos (Wikander et al., 2020b).

Estudos da resposta imune do hospedeiro frente ao *C. felis* ainda são escassos, porém já foi relatada que a gravidade da doença está fortemente relacionada a respostas imunogênicas frente ao protozoário. Assim, foram observados níveis elevados de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e aumento da expressão de moléculas CD18, além da diminuição da albumina (proteína de fase aguda negativa) em animais que morreram de Cytauxzoonose em comparação a gatos saudáveis (Frontera-Acevedo et al., 2013). O aumento da expressão de moléculas de MCH classe II no endotélio de pulmões de felinos infectados, comparados com os órgãos de animais não infectados, também corrobora para essa hipótese, já que MCH II são ativados e induzidos por TNF- α e IFN- γ (Interferon- γ). O endotélio ativado, juntamente com o aumento desses mediadores inflamatórios, ativaria também a produção de óxido nítrico, o que resultaria na perda de líquido para o espaço extravascular e vasodilatação, causando, finalmente, congestão e edema pulmonar (Frontera-Acevedo; Sakamoto, 2015).

Os achados histopatológicos mais descritos na Cytauxzoonose são esplenomegalia, baço com bordas arredondadas, fígado difusamente amarelo-acastanhado, além de pulmões sem colapso mas com múltiplos focos de hemorragia (Aschenbroich et al., 2012), edema pulmonar e pneumonia intersticial com oclusão vascular (Snider et al., 2010). Já lesões cerebrais estão associadas à oclusão vascular e isquemia secundária causada pela infecção do protozoário, representada pelos esquizontes e a presença de células inflamatórias no local (Clarke; Rissi, 2015; Clarke et al., 2017). Os pulmões, baço e fígado são os órgãos mais gravemente afetados, mas praticamente qualquer órgão parenquimatoso pode ser afetado (Meinkoth; Kocan, 2005).

1.8. Diagnóstico

A detecção de merozoítos de piroplasmídeos em esfregaço sanguíneo pode ocorrer nos casos de infecção por qualquer um dos três piroplasmas de felinos – *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* (Hartman et al., 2013). No entanto, a observação de piroplasmídeos intraeritrocitários em amostras de sangue periférico à microscopia óptica, apesar de ser uma técnica simples e barata, pode apresentar baixa sensibilidade, dependendo da fase da infecção (Hartman et al., 2013). No caso de *Cytauxzoon* sp., a parasitemia das hemácias varia geralmente de 1 a 2% no início da infecção até 25% com a progressão da doença (Meier;

Moore, 2000). O diagnóstico morfológico também apresenta baixa acurácia em comparação ao diagnóstico molecular. Um exemplo disso é a diferenciação de um agente à microscopia óptica de acordo com seu tamanho. Em estudo recente, um piroplasmídeo inicialmente identificado à microscopia óptica como sendo uma *Babesia* grande foi confirmado molecularmente e posteriormente como *B. felis*, espécie de pequena *Babesia* (Bosman et al., 2019). O quadro 6 correlaciona as espécies de *Babesia* que infectam gatos domésticos de acordo com a classificação clássica de tamanho e morfologia desses parasitas, durante sua observação em esfregaço sanguíneo em exame de microscopia óptica.

Quadro 6: Características morfológicas das espécies de *Babesia* que infectam gatos domésticos. Fontes: (Ayoob et al., 2010; Bosman et al., 2010; Lempereur et al., 2017; Baneth et al., 2019; Bosman et al., 2019).

Espécie de <i>Babesia</i>	Dimensões	Tamanho (µm)	Morfologia
<i>Babesia felis</i>	pequena	0,9 x 0,7	Corpúsculo anular único ou em par
<i>Babesia leo</i>	pequena	1 x 1	Corpúsculo anular arredondado a oval
<i>Babesia microti</i>	pequena	1 x 2,5	Corpúsculo anular único
<i>Babesia hongkongensis</i>	pequena	1,4 x 1,6	Formato e anel de sineto
<i>Babesia lengau</i>	pequena	0,8 – 1,8	Formato redondo a oval
<i>Babesia vulpes</i>	pequena	0,8 x 1,33	Formato arredondado a oval, núcleo excêntrico
<i>Babesia canis subsp. presentii</i>	grande	1,7 x 2,7	Formato de anel, arredondado a oval, único ou em par
<i>Babesia vogeli</i>	grande	2,5 x 5,0	Formato piriforme, única ou em par
<i>Babesia canis</i>	grande	3 x 5	Formato piriforme, única ou em par
<i>Babesia bigemina</i>	grande	2,5 x 3,5	Formato piriforme, única
<i>Babesia Western Cape</i>	grande	3,13 x 2,5	Formas redondas, ovais ou ameboides

A suspeita de Cytauxzoonose se inicia a partir dos sinais mais comuns da doença, como anorexia, letargia e icterícia, quando são observados em animais oriundos de áreas endêmicas para o agente (Holman; Snowden, 2009; Wang et al., 2017). O diagnóstico pode

ser realizado pela presença de *Cytauxzoon* spp em amostras de sangue periférico ou em tecidos contendo o agente (Birkenheuer et al., 2006a; Lloret et al., 2015).

Adicionalmente, o formato do *C. felis* pode ser pleomórfico, o que dificulta a distinção com outros piroplasmídeos. Dessa forma, além do clássico formato em anel de sinete, considerado característico do *C. felis*, eles também podem ser identificados como estruturas bipolares ovais, como “pontos redondos anaplasmoídes”, ou ainda com formatos de vírgula ou tetrade. Tipicamente, esses parasitas têm 1-2 µ de diâmetro, mas podem variar de 0,2-2,5 (Sherrill; Cohn, 2015). A figura 8 apresenta desenho esquemático do *Cytauxzoon* spp em comparação com outros diagnósticos diferenciais para o patógeno, os quais também podem ser observados à microscopia. Notar que mesmo o anel de sinete – considerado característico do *Cytauxzoon* sp - também pode ser encontrado nas infecções por outros hemoparasitas de felídeos (Wang et al., 2017).

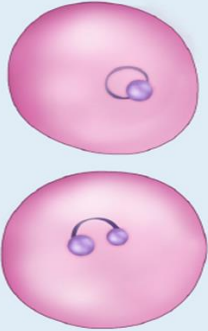
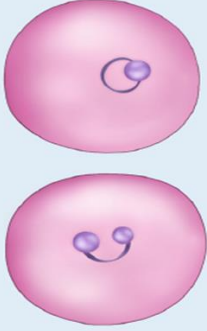
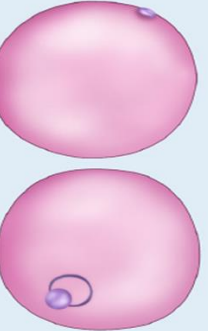
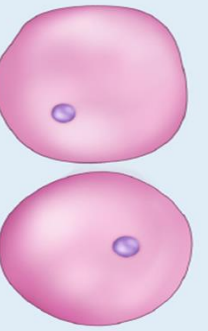
<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Babesia</i> spp. <i>Theileria</i> spp.	<i>Mycoplasma haemofelis</i> (<i>Haemobartonella felis</i>)	Corpúsculo de Howell- Jolly
			
1-2µm Geralmente formato de anel, ocasionalmente formato de alfinete	Indistinguível de <i>C. felis</i> . Não endêmico nos EUA; Febre e icterícia incomuns	Geralmente na margem ou sobre a superfície da hemácia; Raramente em formato de anel. Idade mais jovem; Gênero macho	1-2µm Apenas com cromatina corada, sem citoplasma ao redor

Figura 8: Diferenciação microscópica de *Cytauxzoon felis* de outros patógenos intraeritrocitários ou partículas, em um esfregaço sanguíneo de felino (Adaptado de Wang et al., 2017).

A figura 9 apresenta um esfregaço sanguíneo de felino, corado por Wright-Giemsa, e que demonstra a forma de anel de sinete do *Cytauxzoon* sp.

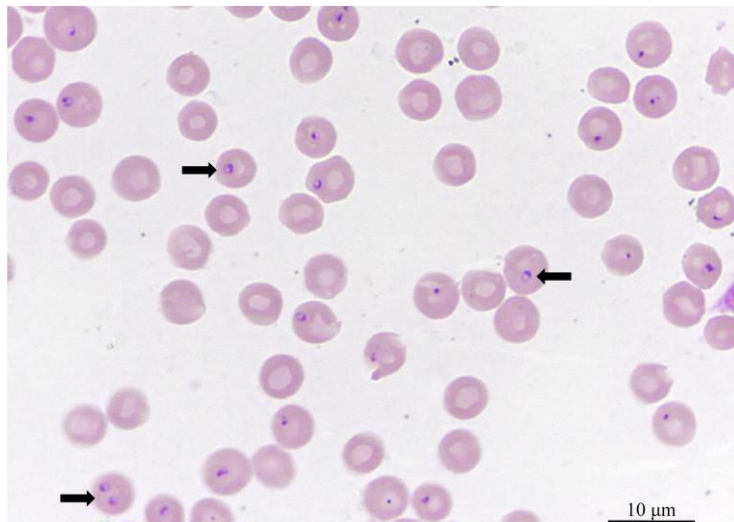


Figura 10: Anéis de sinete, em destaque nas setas, observados à microscopia óptica (Panait et al., 2020).

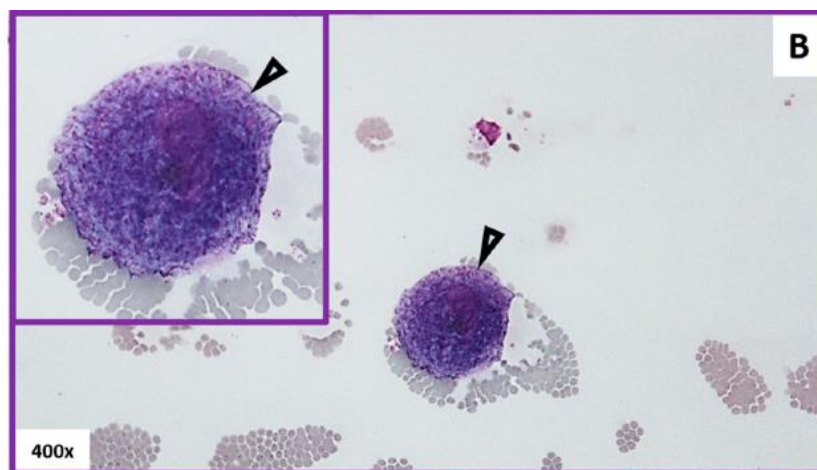


Figura 9: Diagnóstico patológico de Cytauxzoonose aguda. Cauda de esfregaço sanguíneo com monócito parasitado por esquizontes (Wikander; Kang; Reif, 2020).

Cabe salientar que a presença de esquizontes parasitando macrófagos fornece um diagnóstico morfológico patognomônico da doença (Sherrill; Cohn, 2015). Essa forma pode ser observada tanto em esfregaços sanguíneos quanto em aspirados ou exame anátomo-patológico de órgãos de animais infectados. Os esquizontes, quando detectados, são específicos da doença aguda, porque esse é o primeiro ciclo de vida que se desenvolve no hospedeiro felino após a inoculação de esporozoítos pelo carrapato vetor (Wikander et al., 2020b). A figura 10 mostra a presença de esquizontes dentro de monócitos em esfregaço sanguíneo de felino com infecção aguda por *Cytauxzoon felis*.

Além do sangue periférico, os esquizontes dentro de macrófagos podem ser encontrados virtualmente em qualquer tecido do corpo, sendo mais numerosos nos pulmões, baço e fígado (Meinkoth and Kocan, 2005). A figura 11 mostra esquizontes parasitando pulmão de um felino acometido pela *Cytauxzoonose*.

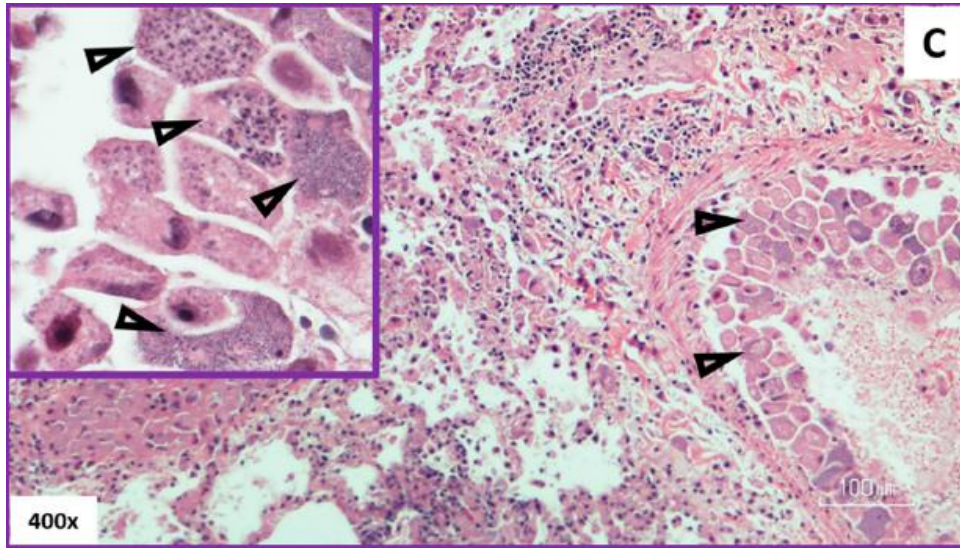


Figura 11: Corte histológico de pulmão com esquizontes aderidos ao endotélio (pontas de flechas abertas) dentro de um vaso (Wikander; Kang; Reif, 2020).

As alterações laboratoriais que gatos domésticos infectados por *B. felis* frequentemente apresentam incluem anemia regenerativa, monocitose e neutrofilia (Jacobson et al., 2000; Schoeman et al., 2001; Penzhorn et al., 2004). A causa da anemia é multifatorial, ocorrendo hemólise tanto intra quanto extravascular, além de eritrofagocitose (Ayoob et al., 2010). Trombocitopenia não foi relatada como manifestação clínica associada à doença, e, mesmo ocorrendo, a diminuição de plaquetas em gatos suspeitos deve primeiramente excluir a possibilidade de agregados plaquetários, comuns nessa espécie (Schoeman et al., 2001).

Com relação a *Cytauxzoon felis*, o hemograma com avaliação do esfregaço sanguíneo é um teste singularmente útil para *Cytauxzoonose*. Anemia é um achado comum, sendo tipicamente regenerativa e hemolítica; entretanto, em casos hiperagudos, pode-se apresentar como não regenerativa (Nentwig et al., 2018). Pode haver ainda leucopenia e trombocitopenia, geralmente associadas a mau prognóstico ou como consequência de coagulação intravascular disseminada, respectivamente (Sherrill; Cohn, 2015; Alho et al., 2016). A associação de anemia, leucopenia e trombocitopenia, caracterizando pancitopenia,

é a alteração mais comumente descrita (Meinkoth; Kocan, 2005; Birkenheuer et al., 2006a). Além disso, linfopenia indicando leucograma de estresse (Sherrill; Cohn, 2015) e leucocitose neutrofílica também podem estar presentes (Moghaddam et al., 2020).

Quanto à análise bioquímica, a hiperbilirrubinemia é considerada a alteração mais comum na infecção pelo *Cytauxzoon felis* (Meinkoth; Kocan, 2005; Birkenheuer et al., 2006a), seguida de hiperglicemia, hipoproteinemia ou hiperproteinemia, dependendo da fase da doença, e ainda hipocalcemia (Sherrill; Cohn, 2015; Moghaddam et al., 2020). São descritos ainda aumentos nas concentrações das enzimas ALT e AST, além do aumento de globulinas em animais convalescentes (Harvey et al., 2007). As anormalidades bioquímicas estão associadas com eritrofagocitose e à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Lloret et al., 2015).

De forma semelhante, o aumento da concentração das bilirrubinas séricas, associado ao aumento da ALT, também se mostrou comum nos casos de Babesiose causada pela *B. felis*. Outras alterações que podem ser encontradas são o aumento das proteínas séricas, bem como o aumento das globulinas e os distúrbios eletrolíticos (Schoeman et al., 2001). Albumina pode estar aumentada, refletindo desidratação, e pode haver ainda aumento nas concentrações de FA e GGT. Por outro lado, alterações nos valores de ureia e creatinina não são associadas à doença (Ayoob et al., 2010).

Alterações na hemostasia de animais positivos para *C. felis* incluem, além da trombocitopenia, aumento do tempo de protrombina e hipercoagulabilidade à tromboelastometria, relacionados à evidente Coagulação Intravascular Disseminada, a CID. Além disso, diminuição da atividade de proteína C reativa, justificada pela produção hepática prejudicada ou aumento da demanda periférica, também foi observada. O papel da deficiência de proteína C reativa, nos casos de distúrbios hemostáticos, estaria relacionado a seus efeitos anticoagulante, anti-inflamatório e pró-fibrinolítico (Conner et al., 2015).

Com relação a exames de imagem, achados inespecíficos como hepatoesplenomegalia à ultrassonografia e/ou radiografia abdominal podem ser observados na Cytauxzoonose (Lloret et al., 2015). Em estudo retrospectivo com 37 felinos domésticos apresentando a doença aguda, não foi observada alteração patognomônica em radiografias torácicas desses animais, mesmo naqueles com lesão histológica (Melco et al., 2021).

O diagnóstico sorológico para ambos os casos de Cytauxzoonose e Babesiose felina não é frequentemente utilizado, e não existem kits comerciais disponíveis para detecção de anticorpos do agente, apesar de animais infectados possuírem a capacidade de produção de anticorpos (Frontera-Acevedo et al., 2013; Wang et al., 2017). Isso se deve à dificuldade técnica de se produzir antígenos purificados, além da detecção de anticorpos não ser útil para casos agudos da doença, em que o animal pode ir a óbito antes do início da soroconversão (Ayoob et al., 2010). Reações cruzadas com *Babesia* sp também já foi aventada (André et al., 2011). Ademais, a sorologia também não auxilia nos casos de animais infectados mas assintomáticos, que geralmente apresentam títulos muito baixos de anticorpos (Wang et al., 2017).

Finalmente, a detecção molecular desses piroplasmídeos de felinos por meio da PCR é amplamente utilizada, sendo a ferramenta mais sensível para a detecção desses parasitas (Ayoob et al., 2010; Meredith et al., 2019; Qurollo, 2019). Os genes alvos utilizados no caso da Cytauxzoonose incluem o 18S rRNA (Birkenheuer et al., 2006b; Panait et al., 2021), ITS1 e ITS2 (Bondy et al., 2005; Brown et al., 2008; Brown et al., 2009a; Brown et al., 2009b), além dos mitocondriais Ciclooxygenase – *Coi* (Panait et al., 2021) e *Cox3* (Schreeg et al., 2016a) e Citocromo oxidase – *CytB* (Panait et al., 2021). De forma semelhante, o 18S rRNA é o mais comumente utilizado no diagnóstico da Babesiose felina (Penzhorn; Oosthuizen, 2020). Genes mitocondriais têm apresentado maior sensibilidade na detecção de parasitas do filo Apicomplexa em comparação ao 18S, fato que pode ser justificado pelo número aumentado de mitocôndrias e genes mitocondriais nas amostras, podendo ser de 2 a 150 vezes mais numerosos que o genoma cromossômico em um único parasita (Schreeg et al., 2016a). A PCR é especialmente importante para o diagnóstico da Cytauxzoonose, pois a rápida detecção da doença pode permitir o tratamento precoce, o que por sua vez pode aumentar as chances de sobrevivência de felinos agudamente infectados (Schreeg et al., 2016a). No caso da Theileriose felina, os três únicos relatos de casos do agente no mundo detectaram esse piroplasma utilizando o gene 18S rRNA, tanto usando a PCR convencional (André et al., 2014; André et al., 2015) quanto a qPCR (Sacristán et al., 2019).

1.9. Tratamento

Sempre é recomendado o tratamento para casos de infecção por *B. felis*, pois a doença pode se tornar fatal se não tratada (Hartmann et al., 2013). Drogas antiprotozoárias e

tratamento suporte compõem a terapia recomendada. A droga de eleição atualmente é a primaquina (Penzhorn et al., 2000; Jacobson et al., 2000; Penzhorn et al., 2004; Meredith et al., 2019), que apresenta efeito superior em comparação a outras opções como a associação de Rifampicina e Sulfa com Trimetoprim. Já Bupavorquona, Enrofloxacina e Danofloxacina não apresentam efeito anti-babesial significativo (Penzhorn et al., 2000). Dipropionato de Imidocarb também não mostrou eficácia contra *B. felis*, apesar de ser aparentemente eficiente nos casos de grandes Babesias, enquanto que Aceturato de Diminazeno não é muito utilizado como terapia antibabesial em felinos devido ao seu alto risco de toxicidade (Ayoob et al., 2010).

O tratamento da Cytauxzoonose evoluiu bastante nos últimos anos. Há cerca de uma década atrás apenas o tratamento sintomático e paliativo estavam disponíveis (Sherrill and Cohn, 2015; Lloret et al., 2015). O aceturato de diminazeno, droga efetiva para infecções contra protozoários, não tem uso autorizado em território americano, principal local de ocorrência da Cytauxzoonose de curso agudo e grave (Wang et al., 2017). Atualmente, a associação de Atovaquona com Azitromicina é a terapia mais eficazmente empregada, com índices de 60% de sobrevivência em animais doentes e tratados, comparada com apenas 26% com o uso do Dipropionato de Imidocarb, outra droga antiprotozoários conhecida (Cohn et al., 2011).

Com relação à resposta terapêutica, um genótipo particular do *C.felis*, denominado “Citocromo b genótipo 1 – cytb1” estaria associado à maior sobrevivência de animais com Cytauxzoonose e tratados com a Atovaquona, na comparação com outros genótipos (Schreeg et al., 2013; Schreeg et al., 2015). Uma das hipóteses para isso seria de que substituições sinônimas de nucleotídeos no gene *CytB* que caracterizam o genótipo cytb1 poderiam impactar na estrutura da proteína e alterar a ligação da Atovaquona (Schreeg et al., 2013).

Adicionalmente, estudo recente revelou mutações no gene *CytB* de *C.felis* após o tratamento com Atovaquona e Azitromicina. Essas mutações estão associadas com a resistência à Atovaquona. Especificamente, a metionina hidrofóbica na posição 128 do *CytB* é substituída pelo aminoácido alifático não polar valina (M128V) ou isoleucina (M128I), no sítio catalítico do complexo citocromo b. Contudo, esses genótipos não parecem ser comuns (Hartley et al., 2020).

Parte 2: Piroplasmas em caninos domésticos

Piroplasmídeos de caninos domésticos compreendem os gêneros *Babesia* spp, *Theileria* spp (Schnittger et al, 2012; Lack et al., 2012) e *Rangelia vitalii* (Soares et al., 2011). Pertencem ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmorida e Família Theileriidae, no caso de *Theileria* spp; e *Babesiidae*, para *Babesia* spp (Solano-Gallego; Baneth, 2011) e *Rangelia vitalii* (Soares, 2014; Lopes et al., 2014). Figura 12.

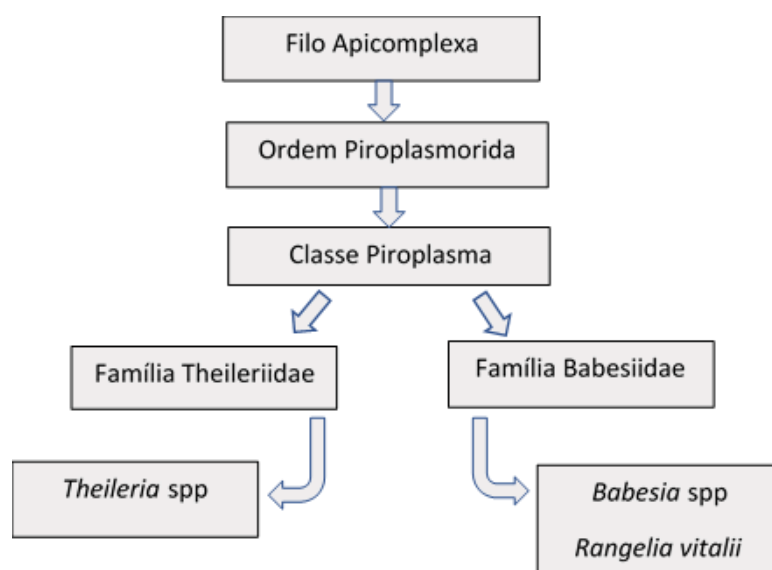


Figura 12: Classificação taxonômica clássica dos piroplasmídeos encontrados em caninos.

2.1 Taxonomia dos piroplasmídeos em caninos

Ao contrário de *Babesia* spp e *Theileria* spp, *Rangelia vitalii* não está inserida na classificação filogenética de clados de Jalovecka, 2019. O agente não é cientificamente reconhecido como sendo um gênero distinto de Piroplasmídeo, apesar de apresentar baixa similaridade genética com as principais Babesias e já ter sido identificado parasitando leucócitos, o que não acontece com Babesias sensu strictu (Soares et al., 2011).

2.2 Agentes etiológicos

A Babesiose canina é uma das principais doenças de cães domésticos e canídeos selvagens. A primeira descrição da doença data de 1888, quando o bacteriologista Victor Babes observou micro-organismos parasitando hemácias de bovinos e posteriormente

também em ovinos, o que originou as denominações *Babesia canis* e *Babesia ovis*, respectivamente (Mihalca et al., 2010). Em 1893 Smith e Kilborne descobriram que o agente causador da febre do gado do Texas não era uma bactéria, mas sim “micro-parasitas” que invadiam as hemácias de forma semelhante à Malária (Smith; Kilborne, 1893). No mesmo ano Starcovici os nomeou como *Babesia bigemina*. Logo após, em 1895, Piana e Galli-Valerio relataram a doença em um cão de caça (Amici, 2001). Desde então, a *Babesia* spp vem sendo reconhecida como uma importante enfermidade de distribuição mundial, causadora de febre e anemia hemolítica em seus hospedeiros (Schoeman, 2009).

Originalmente, as *Babesia* spp. de caninos eram classificadas em apenas dois grupos de acordo com seu tamanho: grande Babesia – *Babesia canis* (3,0-5,0 µm) ou pequena Babesia – *Babesia gibsoni* (0,5-2,5µm) (Boozer; Macintire, 2003). Com o desenvolvimento de métodos moleculares e análises filogenéticas, foi demonstrado que havia outras espécies as quais eram similares entre si com relação às características morfológicas, mas diferentes geneticamente. Atualmente, *Babesia canis*, *Babesia rossi* e *Babesia vogeli*, previamente consideradas subespécies (Uilenberg et al., 1989), são espécies distintas do gênero (Zahler et al, 1998; Carret et al, 1999). Com relação aos pequenos piroplasmas, eles foram posteriormente reagrupados em *Babesia conradae* e *Babesia microti-like* (*Theileria annae*; Solano-Gallego; Baneth, 2011). Em 2015 foi sugerida a reclassificação da *Theileria annae* como *Babesia vulpes* para substituir seus outros nomes, como piroplasma *Babesia microti-like*, *Babesia* de cão isolado da Espanha, *Babesia annae* e *Babesia cf microti*. Após quatro anos sendo considerada um nome inválido (Baneth et al, 2015; Harris, 2016), em 2019 a *Babesia vulpes* foi estabelecida e reconhecida como espécie distinta (Baneth et al., 2019). Recentemente, uma nova espécie, de tamanho intermediário comparado com outras Babesias, foi relatada em Israel e nomeada *Babesia negevi* (Baneth et al., 2020). No Brasil, apenas *Babesia gibsoni* (Trapp et al, 2006; Shigueru et al., 2008), *Babesia caballi* (de Sousa et al., 2018) e *Babesia vogeli* foram relatadas em cães até o momento, e há relatos da espécie *Babesia vogeli* em todas as regiões do país (Dantas-Torres; Figueredo, 2006; Panti-may; Rodríguez-vivas, 2020). Ademais, em estudo realizado por Vasconcelos, 2010, foi detectada a presença de material genético de *Babesia rossi* em cães do Distrito Federal, entretanto não foi realizado sequenciamento da amostra para confirmação do agente etiológico (Vasconcelos, 2010).

A espécie *Theileria equi* tem se mostrado uma das mais comuns quanto à infecção em caninos domésticos (Criado-Fornelio et al., 2003c; Beck et al., 2009; Fritz, 2010; Qablan et al., 2012; Rosa et al., 2014; Adamu et al., 2014; Salim et al., 2019), seguida de *Theileria annulata* (Criado et al., 2006; Bigdeli et al., 2012; Aktas et al., 2015; Rjeibi et al., 2016; Habibi et al., 2020) e *Theileria* não classificada, a *Theileria* sp (Matjila et al., 2008a; Matjila et al., 2008b; Kamani et al., 2013; Adamu et al., 2014; Rosa et al., 2014). Casos de infecções ocasionais foram descritas para as espécies *Theileria ovis* (Sili et al., 2021), *Theileria orientalis* (Xu et al., 2015) e *Theileria velifera* (Salim et al., 2019).

2.3 Distribuição geográfica e prevalência

A primeira descrição molecular de Theileriose em cães domésticos data de 2003, na Espanha. O agente identificado foi *Theileria equi*, com prevalência de 18,2% (Criado-Fornelio et al., 2003c). Com o passar dos anos esse piroplasmídeo foi identificado em outras regiões da Europa (Criado et al., 2006; Beck et al., 2009; Fritz, 2010), além de em outros continentes como África (Matjila et al., 2008a; Matjila et al., 2008b; Kamani et al., 2013; Adamu et al., 2014; Rosa et al., 2014; Rjeibi et al., 2016; Sili et al., 2021), Ásia (Qablan et al., 2012; Bigdeli et al., 2012; Aktas et al., 2015; Xu et al., 2015; Salim et al., 2019; Díaz-Regañón et al., 2020; Habibi et al., 2020), e, recentemente, foi descrito um único caso na América do Sul, no Paraguai (Inácio et al., 2019). As prevalências variam de 0,1% (Xu et al., 2015; Aktas et al., 2015) a 50% (Salim et al., 2019), sendo esses casos relatados na Ásia. Variadas espécies já foram identificadas molecularmente, conforme quadro 7.

Quadro 7: Distribuição de *Theileria* spp. em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Paraguai	<i>Theileria equi</i>	0,3%	(Inácio et al., 2019)
Europa	Espanha	<i>Theileria equi</i>	18,2%	(Criado-Fornelio et al., 2003c)
	França	<i>Theileria equi</i>	22%	(Fritz, 2010)
	Croácia	<i>Theileria equi</i>	1,3%	(Beck et al., 2009)

	Espanha	<i>Theileria annulata</i>	1%	(Criado et al., 2006)
África	África do Sul*	<i>Theileria</i> sp	15%	(Matjila et al., 2008a)
	África do Sul	<i>Theileria</i> sp	5,9%	(Matjila et al., 2008b)
	Nigéria	<i>Theileria</i> sp	0,6%	(Kamani et al., 2013)
	Nigéria	<i>Theileria</i> sp	9%	(Adamu et al., 2014)
	Nigéria	<i>Theileria equi</i>	3%	
	África do Sul*	<i>Theileria</i> sp	4**	(Rosa et al., 2014)
	África do Sul*	<i>Theileria equi</i>	2**	
	Angola	<i>Theileria ovis</i>	8,2%	(Sili et al., 2021)
	Tunísia	<i>Theileria annulata</i>	2%	(Rjeibi et al., 2016)
Ásia	Nepal	<i>Theileria</i> spp	12,86%	(Díaz-Regañón et al., 2020)
	Irã	<i>Theileria annulata</i>	32,5%	(Habibi et al., 2020)
	China	<i>Theileria orientalis</i>	0,1%	(Xu et al., 2015)
	Irã	<i>Theileria annulata</i>	0,7%	(Bigdeli et al., 2012)
	Turquia	<i>Theileria annulata</i>	0,1%	(Aktas et al., 2015)
	Arábia Saudita	<i>Theileria equi</i>	18,29%	(Salim et al., 2019)
	Arábia Saudita	<i>Theileria velifera</i>	50%	
	Jordânia	<i>Theileria equi</i>	4,44%	(Qablan et al., 2012)

*Sequenciamento genético não realizado; **critério de inclusão: amostras positivas para *Theileria* sp pela PCR e RLB.

A distribuição geográfica de *Babesia* spp em cães domésticos costuma ser delimitada de acordo com a espécie envolvida. Dessa forma, *Babesia canis* é identificada preponderantemente na Europa (Bilić et al., 2018), apesar de já ter sido relatada no Japão (Inokuma et al., 2004) e recentemente na China (Wang et al., 2019; Wang et al., 2020), além de excepcionalmente na África (Kamani et al., 2010). Já *Babesia rossi* ocorre somente na África (Matjila et al., 2004; Oyamada et al., 2005; Matjila et al., 2008a; Allison et al., 2011; Defauw et al., 2020), enquanto *Babesia conradae* e *Babesia* sp Coco foram relatadas apenas no oeste (Kjemtrup et al., 2006; Kjemtrup; Conrad, 2006) e leste dos Estados Unidos, respectivamente (Birkenheuer et al., 2004; Lehtinen et al., 2008; Sikorski et al., 2010). Por outro lado, *Babesia vogeli* e *Babesia gibsoni* apresentam distribuição mundial; *Babesia vulpes* já foi descrita na Europa e América do Norte (Baneth et al., 2019), enquanto *Babesia caballi* tem únicos relatos apenas na Europa (Beck et al., 2009; Gabrielli et al., 2015) e Brasil (de Sousa et al., 2018). Vide quadro 8.

Quadro 8: Distribuição de *Babesia* spp em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Estados Unidos	<i>Babesia</i> sp Coco	1 RC**	(Birkenheuer et al., 2004)
	Estados Unidos	<i>Babesia</i> sp Coco	1 RC**	(Sikorski et al., 2010)
	Estados Unidos	<i>Babesia vulpes</i>	0,6%	(Yeagley et al., 2009)
	Estados Unidos	<i>Babesia gibsoni</i>	91%*** /*****	(Birkenheuer et al., 2005)
	Estados Unidos	<i>Babesia conradae</i>	52,72%***	(Dear et al., 2018)

	Colombia	<i>Babesia</i> sp Coco	5,4%	(Vargas-Hernández et al., 2012)
	Colombia	<i>Babesia vogeli</i>	26%***	(Galván et al., 2018)
	Brasil – Minas Gerais	<i>Babesia vogeli</i>	25%*	(Passos et al., 2005)
	Brasil – Minas Gerais	<i>Babesia vogeli</i>	4,91%	(Costa-Júnior et al., 2009)
	Brasil – Minas Gerais	<i>Babesia vogeli</i>	10,8%	(Costa-Júnior et al., 2012)
	Brasil – Minas Gerais	<i>Babesia vogeli</i>	17 RC*/**	(Barbosa et al., 2020)
	Brasil - Paraná	<i>Babesia gibsoni</i>	4RC*/**	(Trapp et al., 2006b)
	Brasil - Paraná	<i>Babesia vogeli</i>	10,9%	(Ribeiro et al., 2017)
	Brasil - Paraná	<i>Babesia vogeli</i>	23,4%*** /*****	(Jojima, et al., 2008)
		<i>Babesia gibsoni</i>	13,8%*** /*****	
	Brasil – Rio de Janeiro	<i>Babesia vogeli</i>	0,97%	(Lemos et al., 2012)
	Brasil – Rio de Janeiro	<i>Babesia vogeli</i>	15,66%	(Paulino et al., 2018)
	Brasil - Maranhão	<i>Babesia vogeli</i>	3,33%*****	(Silva et al., 2012)
	Brasil - Maranhão	<i>Babesia</i> spp	0,9%*****	(Costa et al., 2015)
	Brasil - Pará	<i>Babesia vogeli</i>	22%	(Moraes et al., 2014)
	Brasil - Pará	<i>Babesia vogeli</i>	15,7%	(Moraes et al., 2015)
	Brasil - Pernambuco	<i>Babesia vogeli</i>	7,31%	(Ramos et al., 2010)
	Brasil - Pernambuco	<i>Babesia vogeli</i>	4,8%	(Da Silva et al., 2016)

	Brasil - Paraíba	<i>Babesia vogeli</i>	10%	(Rotondano et al., 2015)
	Brasil – Espírito Santo	<i>Babesia/Theileria</i>	21,7%****	(Spolidorio et al., 2010)
	Brasil – Espírito Santo	<i>Babesia vogeli</i>	1,32%	(Vieira et al., 2018)
	Brasil – São Paulo	<i>Babesia vogeli</i>	8%	(O’Dwyer et al., 2009)
	Brasil – São Paulo	<i>Babesia spp</i>	8,1****	(Santos et al., 2009)
	Brasil – São Paulo	<i>Babesia vogeli</i>	12 RC**/****	(Oliveira et al., 2009)
	Brasil – Mato Grosso	<i>Babesia vogeli</i>	3,13%	(Melo et al., 2016)
	Brasil – Mato Grosso	<i>Babesia vogeli</i>	6 RC**	(Spolidorio et al., 2011)
	Brasil – Mato Grosso	<i>Babesia vogeli</i>	2,5%	(Castro et al., 2020)
	Brasil – Mato Grosso do Sul	<i>Babesia vogeli</i>	3,3%	(Sousa et al., 2013)
	Brasil – Mato Grosso do Sul	<i>Babesia vogeli</i>	14,2%	(de Sousa et al., 2018)
		<i>Babesia caballi</i>	2,38%	
	Brasil - Goiás	<i>Babesia vogeli</i>	3,93%	(Duarte et al., 2011)
	Chile	<i>Babesia vogeli</i>	6,3%	(Di Cataldo et al., 2020)
	Argentina	<i>Babesia vogeli</i>	0,2%	(Eiras et al., 2008)

	Argentina	<i>Babesia vogeli</i>	7,7%	(Mascarelli et al., 2016)
	Venezuela	<i>Babesia vogeli</i>	2,24%	(Criado-Fornelio et al., 2007)
	Paraguay	<i>Babesia vogeli</i>	5,5%	(Inácio et al., 2019)
	Peru	<i>Babesia vogeli</i>	1,4%	(Temoche et al., 2018)
	Nicarágua	<i>Babesia gibsoni</i>	10,35%	(Wei et al., 2014)
		<i>Babesia vogeli</i>	15,38%	
	Haiti (Caribe)	<i>Babesia vogeli</i>	7,7%	(Starkey et al., 2016)
	Grenada (Caribe)	<i>Babesia vogeli</i>	7%	(Yabsley et al., 2008)
	Trinidad and Tobago	<i>Babesia vogeli</i>	6,7%****	(Georges et al., 2008)
	Saint Kitts and Nevis (Caribe)	<i>Babesia vogeli</i>	48%	(Kelly et al., 2013)
		<i>Babesia gibsoni</i>	40%	
	Costa Rica	<i>Babesia vogeli</i>	20%	(Wei et al., 2015)
		<i>Babesia gibsoni</i>	5%	
	Costa Rica	<i>Babesia vogeli</i>	8%	(Rojas et al., 2014)
	Mexico	<i>Babesia vogeli</i>	6,66%	(Lira-Amaya et al., 2017)
	Estados Unidos	<i>Babesia gibsoni</i>	2%	(Barash et al., 2019)
<i>Babesia vulpes</i>		0,51%		
<i>Babesia vogeli</i>		0,31%		
<i>Babesia canis</i>		0,19%		
<i>Babesia sp Coco</i>		0,17%		
<i>Babesia conradae</i>		0,01%		
Ásia	China	<i>Babesia canis</i>	5,4%	(Wang et al., 2019)
		<i>Babesia canis</i>	3,5%	(Wang et al., 2020)

		<i>Babesia vogeli</i>	0,87%	
	China	<i>Babesia vogeli</i>	11%	(Li et al., 2020)
	China	<i>Babesia gibsoni</i>	64,23%***	(Guo et al., 2020)
	Índia	<i>Babesia vogeli</i>	10%	(Manoj et al., 2020)
	Índia	<i>Babesia vogeli</i>	5,5%	(Abd Rani et al., 2011)
		<i>Babesia gibsoni</i>	0,2%	
	Índia	<i>Babesia gibsoni</i>	50%	(Augustine et al., 2017)
		<i>Babesia vogeli</i>	7,5%	
	Índia	<i>Babesia gibsoni</i>	28,6%***	(Singh et al., 2016)
	Índia	<i>Babesia gibsoni</i>	15,42***/*	(Singh et al., 2014)
	Índia	<i>Babesia gibsoni</i>	47,3%	(Jain et al., 2017)
	Índia	<i>Babesia gibsoni</i>	15,04%	(Singla et al., 2016)
		<i>Babesia vogeli</i>	0,26%%	
	Índia	<i>Babesia vogeli</i>	1,21%	(Mittal et al., 2019)
		<i>Babesia gibsoni</i>	14,24%	
	Israel	<i>Babesia negevi</i> n. sp	5 casos**	(Baneth et al., 2020)
	Filipinas	<i>Babesia vogeli</i>	9 casos**	(Ybañez et al., 2017)
	Malásia	<i>Babesia vogeli</i>	2,08%	(Prakash et al., 2018)
Japão	<i>Babesia canis</i>	6,3%	(Inokuma et al., 2004)	
	<i>Babesia gibsoni</i>	8,8%		
Austrália	Austrália	<i>Babesia vogeli</i>	41,17%	(Jefferies et al., 2003)
	Austrália	<i>Babesia gibsoni</i>	9,27%	(Jefferies et al., 2007b)
África	Tunisia	<i>Babesia vogeli</i>	6,66%	(M'ghirbi and Bouattour, 2008)
	Zâmbia	<i>Babesia gibsoni</i>	32,2%****	(Nalubamba et al., 2015)
		<i>Babesia rossi</i>	8%****	
	Uganda	<i>Babesia rossi</i>	7,8%	(Proboste et al., 2015)
	Nigéria	<i>Babesia canis</i>	1RC**	(Kamani et al., 2010)
<i>Babesia rossi</i>		1RC**		

	Nigéria	<i>Babesia rossi</i>	2%	(Sasaki et al., 2007)
		<i>Babesia vogeli</i>	0,3%	
	Sudão	<i>Babesia rossi</i>	6,41%	(Oyamada et al., 2005)
		<i>Babesia vogeli</i>	2,56%	
	África do Sul	<i>Babesia rossi</i>	75%	(Matjila et al., 2008a)
		<i>Babesia vogeli</i>	3%	
África do Sul	<i>Babesia rossi</i>	10,43%	(Matjila et al., 2004)	
	<i>Babesia vogeli</i>	4,37%		
Europa	França	<i>Babesia vogeli</i>	13,6%***	(René-Martellet et al., 2015)
		<i>Babesia canis</i>	12,9%***	
		<i>Babesia vulpes</i>	0,7%***	
	Croácia*	<i>Babesia canis</i>	2,3%	(Beck et al., 2009)
		<i>Babesia caballi</i>	1,3%	
		<i>Babesia vogeli</i>	0,2%%	
		<i>Babesia vulpes</i>	0,1%	
	Espanha	<i>Babesia vulpes</i>	157 RC*/**	(Camacho et al., 2001)
	Itália	<i>Babesia vogeli</i>	6,7%	(Solano-Gallego et al., 2008)
	Sérvia	<i>Babesia vulpes</i>	10,1%	(Gabrielli et al., 2015)
		<i>Babesia caballi</i>	1,9%	
		<i>Babesia gibsoni</i>	5,7%	
		<i>Babesia vogeli</i>	1,9%	
	Portugal	<i>Babesia canis</i>	87,5***	(Cardoso et al., 2008)
<i>Babesia vogeli</i>		12,5%***		
Espanha	<i>Babesia vogeli</i>	0,01%	(Criado-Fornelio et al., 2007)	
Espanha	<i>Babesia vulpes</i>	1,9%	(Camacho et al., 2005)	
Suécia	<i>Babesia vulpes</i>	1RC**	(Falkenö et al., 2013)	
Portugal	<i>Babesia vulpes</i>	3RC**	(Brilhante Simões et al., 2011)	
Alemanha	<i>Babesia gibsoni</i>	2RC**	(Hartelt et al., 2007)	

	Sérvia	<i>Babesia canis</i>	96,7%*/***	(Davitkov et al., 2015)
		<i>Babesia gibsoni</i>	3,3*/**	
	Italia	<i>Babesia gibsoni</i>	1RC**	(Trotta et al., 2009)
	Espanha	<i>Babesia vogeli</i>	2%	(Tabar et al., 2009)
		<i>Babesia gibsoni</i>	2%	
		<i>Babesia canis</i>	1,3%	
		<i>Babesia vulpes</i>	0,7%	
	França	<i>Babesia vogeli</i>	0,9%	(Criado-Fornelio et al., 2009)
	Hungria	<i>Babesia canis</i>	88,96%***	(Földvári et al., 2005)
	Espanha	<i>Babesia vulpes</i>	62,5%***	(Miró et al., 2015)
		<i>Babesia canis</i>	10%***	
		<i>Babesia gibsoni</i>	2,5%	
	Portugal	<i>Babesia vulpes</i>	3 RC**/***	(Simes et al., 2011)
	Turquia	<i>Babesia vogeli</i>	3RC**/***	(Gülanber et al., 2006)
	Turquia	<i>Babesia canis</i>	0,13%	(Aktas et al., 2015)
	Albania	<i>Babesia canis</i>	13,33%	(Hamel et al., 2009)
		<i>Babesia vogeli</i>	10%	
	Itália	<i>Babesia canis</i>	2,33%	(Cassini et al., 2009)
	Itália	<i>Babesia vogeli</i>	4%***	(Solano-Gallego et al., 2015)
	Lituânia	<i>Babesia canis</i>	87,8%***	(Paulauskas et al., 2014)
Polônia	<i>Babesia canis</i>	25,3%	(Welc-Faleciak et al., 2009)	
Polônia	<i>Babesia canis</i>	90,8%*/***	(Adaszek and Winiarczyk, 2008)	
Eslováquia	<i>Babesia canis</i>	3,5%	(Víchová et al., 2014)	
Noruega	<i>Babesia canis</i>	1 RC**	(Øines et al., 2010)	
Romênia	<i>Babesia canis</i>	71,4%***	(Imre et al., 2013)	
	<i>Babesia gibsoni</i>	28,6%***		

	Romênia e Hungria	<i>Babesia canis</i>	43,1%	(Hamel et al., 2012)
		<i>Babesia vogeli</i>	2,3%	
		<i>Babesia gibsoni</i>	1,9%	
	Eslovênia	<i>Babesia canis</i>	4,6%	(Duh et al., 2004)
		<i>Babesia vogeli</i>	1,3%	

*animais previamente positivos à microscopia óptica; **RC: relato de caso; ***animais com sinais de piroplasmose; ****análise molecular sem sequenciamento gênico

Outro Piroplasmídeo que tem ganhado destaque no meio acadêmico nos últimos anos causa uma doença que pode ser considerada emergente: a Rangeliose. Também conhecida como *Nambyuvú* (em guarani significa: “orelha que sangra”), é causada pelo protozoário *Rangelia vitalii* (Soares et al., 2011) e foi relatada primeiramente por Carini em 1908 (Lopes et al., 2014). No entanto, nas décadas seguintes foi erroneamente confundida com outros hemoparasitas, principalmente com a *Babesia canis*, devido à similaridade morfológica entre as duas quando observadas à microscopia óptica. Em 2005 foi identificado um possível novo agente, cujo ciclo endotelial diferia de qualquer outro piroplasmídeo comumente conhecido, porém a identificação molecular não foi realizada naquele momento (Loretti; Barros, 2005). Posteriormente, a identificação no sul do Brasil de um hemoparasita que infectava leucócitos de sete cães com sinais característicos da Rangeliose contribuiu para a caracterização clínica e laboratorial do agente (França et al., 2010). Finalmente, em 2011, houve a revalidação da espécie por meio do diagnóstico molecular do seu agente etiológico (Soares et al., 2011).

A Rangeliose em cães domésticos vem apresentando distribuição geográfica cada vez mais abrangente nos últimos anos, apesar de só ocorrer na América Latina até o momento. Há relatos no Brasil nos estados do Rio Grande do Sul (Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Soares et al., 2011; Gottlieb et al., 2016; Malheiros et al., 2016), Paraná (Mongruel et al., 2017; Silva; et al., 2019), Rio de Janeiro (Lemos et al., 2012; Lemos et al., 2017), Minas Gerais (Moreira et al., 2013) e São Paulo (Fournier et al., 2020). Fora do Brasil, já foi relatada na Argentina (Eiras et al., 2014; Sánchez, RO.; Moré, G; Eiras, 2017; Borrás et al., 2020), Uruguai (Soares et al., 2015; Rivero et al., 2017) e recentemente no Paraguai (Inácio et al., 2019). A prevalência molecular mundial da infecção por *Rangelia vitalii* em cães domésticos está descrita no quadro 9.

Com relação a animais selvagens, *Rangelia vitalii* já foi descrita em cachorros-domato (*Cerdocyon thous*) (Soares et al., 2014), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*; De Quadros et al., 2015; Da Silva et al., 2018; Souza et al., 2019), e no lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Silveira et al., 2016). Em grande parte dos estudos os canídeos infectados eram assintomáticos e sem alterações em exame laboratoriais, o que avança a hipótese de que esses animais possam ser os reservatórios para o piroplasmídeo (Soares et al., 2014; da Silva, 2018; Souza et al., 2019). Por outro lado, Fredo e colaboradores relataram os casos de dois canídeos selvagens - cachorro-do-campo e graxaim-do-campo - que apresentaram sinais de anemia e icterícia, além da presença de zoítos de *R. vitalii* no endotélio de vários órgãos, achados que indicariam que o parasita seria patogênico não só para canídeos domésticos, mas também para as espécies selvagens (Fredo et al., 2015). Posteriormente foi relatado outro caso de um cachorro-do-mato sintomático e com diagnóstico histopatológico de Rangeliose, o que mais uma vez mostrou que esse canídeo selvagem não atuaria somente como reservatório da *Rangelia vitalii*, mas também estaria sujeito a desenvolver a doença (Copat et al., 2019). No entanto, recentemente foi demonstrado que, à semelhança da curta fase de esquizogonia observada nos lince-pardos (considerados os reservatórios de *Cytauxzoon felis*), os supostos reservatórios da Rangeliose – cachorros-do-mato – também mostraram, na comparação das cargas parasitárias da infecção em canídeos selvagens versus domésticos, que também parece haver uma limitação ou curta-duração da esquizogonia nos animais silvestres (De Lorenzo et al., 2021).

Quadro 9: Distribuição de *Rangelia vitalii* em cães domésticos pelo mundo, considerando diagnóstico molecular.

Continentes	País	Espécie identificada	Prevalência	Referência
América	Brasil – Rio Grande do Sul	<i>Rangelia vitalii</i>	5RC*	(Soares et al., 2011)
	Brasil – Rio Grande do Sul	<i>Rangelia vitalii</i>	7,5%	(Malheiros et al., 2016)

	Brasil – Rio Grande do Sul	<i>Rangelia vitalii</i>	6,8%	(Gottlieb et al., 2016)
	Brasil - Paraná	<i>Rangelia vitalii</i>	1RC*	(Mongruel et al., 2017)
	Brasil - Paraná	<i>Rangelia vitalii</i>	3 casos**	(Silva; et al., 2019)
	Brasil – Rio de Janeiro	<i>Rangelia vitalii</i>	6,8%	(Lemos et al., 2012)
	Brasil – São Paulo	<i>Rangelia vitalii</i>	1,63%	(Fournier et al., 2020)
	Argentina	<i>Rangelia vitalii</i>	1RC*	(Eiras et al., 2014)
	Argentina	<i>Rangelia vitalii</i>	17RC*/**	(Sánchez, RO.; Moré, G; Eiras, 2017)
	Argentina	<i>Rangelia vitalii</i>	1RC*	(Borrás et al., 2020)
	Uruguai	<i>Rangelia vitalii</i>	2RC**	(Soares et al., 2015)
	Uruguai	<i>Rangelia vitalii</i>	9RC*	(Rivero, R., 2017)
	Paraguai	<i>Rangelia vitalii</i>	4%	(Inácio et al., 2019)

*RC: relato de caso; **animais com sinais de piroplasmose.

2.4 Patogenicidade

A patogenicidade da *Theileria* spp em cães ainda não está esclarecida. Há diferentes estudos relatando a mesma espécie de *Theileria* porém com curso clínico diferente. Por exemplo, a espécie *Theileria equi* já foi descrita como causadora de infecção sintomática em cães domésticos (Beck et al., 2009; Fritz, 2010), mas também foi identificada em casos de animais assintomáticos (Qablan et al., 2012; Salim et al., 2019). Da mesma forma, *Theileria annulata* aparenta não ser patogênica na grande maioria dos trabalhos que a identificaram

(Bigdeli et al., 2012; Aktas et al., 2015; Rjeibi et al., 2016; Habibi et al., 2020), apesar de Criado et al., 2006 terem relatado um caso da infecção em hospedeiro canino sintomático. Associado a isso, mesmo a detecção de genótipos diferentes do mesmo agente, no caso da infecção de *Theileria annulata* em cães, não demonstrou se relacionar com diferenças na patogenicidade do protozoário, visto que ambos os genótipos foram observados em casos de infecções em animais assintomáticos (Rjeibi et al., 2016).

No caso da Babesiose canina, a gravidade da doença está relacionada ao agente envolvido, presença de infecções concomitantes, além da idade e *status* imunológico do hospedeiro (Birkenheuer et al, 1999; Schoeman, 2009). Dentre as *Babesia sensu strictu*, *Babesia vogeli* é considerada a de menor patogenicidade, seguida da *Babesia canis* (patogenicidade intermediária) e *Babesia rossi* (alta patogenicidade) (Boozer; Macintire, 2003; Köster et al, 2015; Wang et al., 2018).

Quanto às pequenas Babesias, *Babesia conradae* apresenta-se mais patogênica que a *Babesia gibsoni*, devido à anemia mais intensa e maior mortalidade que causa em relação à primeira (Kjemtrup et al., 2006; Kjemtrup; Conrad, 2006). No entanto, distúrbios renais importantes foram relatados apenas em casos de infecção por *Babesia gibsoni* (Ullal et al., 2018). Já *Babesia vulpes* é descrita como causadora de infecção semelhante às outras pequenas Babesia spp. (Barash et al., 2019), podendo ocorrer, entretanto, à semelhança com *Babesia gibsoni*, casos de azotemia como complicação da doença (Camacho et al., 2004; Checa et al., 2017). Ausência de sinais clínicos também já foi observada para alguns casos de *Babesia gibsoni* (Jefferies et al., 2007b). A figura 13 ilustra a comparação da patogenicidade entre as principais grandes e pequenas *Babesia* spp.

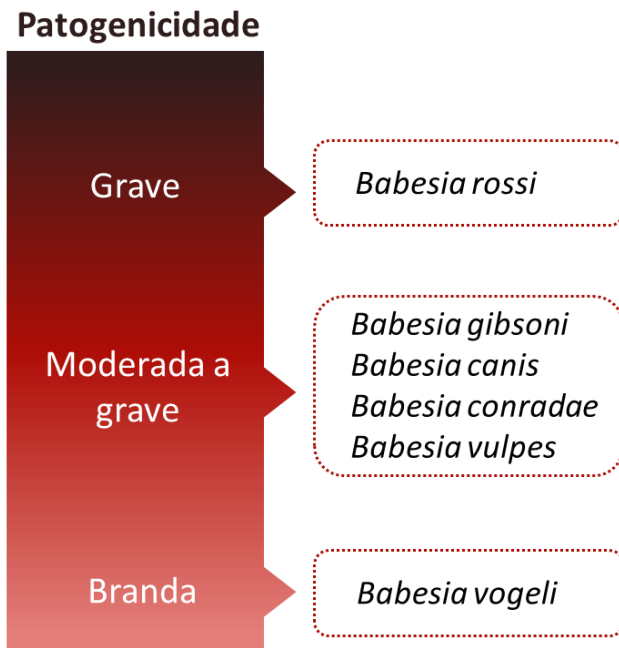


Figura 13: Patogenicidade comparada das principais *Babesia* spp que acometem cães domésticos.

Rangelia vitalii é considerada um parasita de alta patogenicidade e consequente caráter multissistêmico para cães domésticos (Loretti; Barros, 2005; França et al., 2010; Lemos et al., 2012; Rivero et al., 2017).

2.5 Condições predisponentes e associações

Não foram identificados até o momento condições ou fatores predisponentes em cães infectados por *Theileria* spp, visto que os casos desses agentes em hospedeiros caninos são geralmente relatos de estudos populacionais e, por vezes, achados acidentais do contato entre cães e os hospedeiros típicos para a doença (Matjila et al., 2008a; Inácio et al., 2019).

Por outro lado, a Babesiose aparenta apresentar predisposição racial, como no caso do Pastor Alemão para *Babesia canis*. Já cães de caça, American Pit Bulls e American Staffordshire são predispostos para *Babesia gibsoni* (Birkenheuer et al, 2018), especialmente em animais jovens (Birkenheuer et al, 1999; Solano-Gallego et al, 2016). Em estudo que analisou a prevalência da doença em cães envolvidos em brigas, foi observado que animais com cicatrizes na face e membros, sinais característicos de brigas, eram 5,5 vezes mais propensos à infecção comparados àqueles sem as cicatrizes (Yeagley et al., 2009). A alta prevalência da infecção por *Babesia gibsoni* dentre essas raças particulares sugere suscetibilidade racial associada a fatores ambientais, os quais podem levar à alta exposição dos vetores carrapatos (Trotta et al., 2009; Cannon et al., 2016).

Suscetibilidade etária para *Babesia* spp em cães menores de um ano de idade é descrita (Solano-Gallego; Baneth, 2011), provavelmente devido ao sistema imune do animal não estar completamente desenvolvido (Barbosa et al., 2020), e cães com infecções concomitantes ou outras doenças não infecciosas também podem ser mais vulneráveis (Solano-Gallego et al., 2016). Não há predisposição de gênero (Trapp et al., 2006a).

A Rangeliose majoritariamente acomete cães de áreas rurais ou peri-urbanas, locais onde o vetor da doença costuma parasitar carnívoros. Outras condições propícias são regiões com altitudes superiores a 700 metros, ou aquelas cuja baixa temperatura permite o desenvolvimento do carrapato vetor (Soares, 2014). Estações quentes do ano também favorecem o aumento desses carrapatos (França et al., 2010).

2.6 Transmissão e ciclo biológico

Carrapatos do gênero *Hyalomma* são considerados os vetores principais da *Theileria* spp. Entretanto, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, devido à sua vasta distribuição no mundo todo, pode ter um papel importante na transmissão (Habibi et al., 2020).

No geral, a falta de especificidade do parasita pelo seu hospedeiro é considerada incomum no caso da *Theileria* spp, e pode ser considerada como resultado da proximidade do hospedeiro acidental com o hospedeiro comum (Bigdeli et al., 2012), mas também como evidência da importância e presença de animais portadores ou reservatórios para a doença em regiões endêmicas para seus hospedeiros naturais (Rjeibi et al., 2016; Habibi et al., 2020). Outra possibilidade é a falta de um posicionamento filogenético robusto devido à análise de fragmentos pequenos das sequências gênicas amplificadas e utilizadas em alguns desses estudos, o que não identificaria com boa acurácia o real agente envolvido na infecção (de Sousa et al., 2018).

Por outro lado, *Babesia* spp. em geral apresentam uma caracterização mais conhecida de seus vetores. Entretanto, para algumas espécies de *Babesia* o carrapato vetor ou ainda não foi identificado, ou restam dúvidas acerca de outros vetores. Como exemplo, em 2018 Kamani e colaboradores publicaram um estudo em que detectaram na Nigéria a presença de DNA de *Babesia rossi* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, os quais não são considerados vetores do piroplasma. Apesar de a simples identificação molecular do agente

no carrapato não comprovar a capacidade vetorial do *Rhipicephalus sanguineus*, os autores suscitam essa possibilidade em virtude de o *Haemaphysalis elliptica*, sabidamente vetor da *Babesia rossi*, ser infreqüentemente encontrado na região, ao contrário do carrapato marrom (Kamani et al., 2018).

O quadro 10 lista a classificação morfológica atual acerca das *Babesia* spp que acometem cães domésticos, bem como seus vetores identificados.

Quadro 10: Espécies das grandes e pequenas *Babesia* spp. atualmente identificadas em cães, com seus correspondentes vetores. (Adaptado de Bilić et al., 2018; Baneth et al., 2020).

Tamanho	Espécie	Carrapato vetor
Grandes (2,5-5,0 µm)	<i>Babesia canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i>
	<i>Babesia caballi</i>	Desconhecido
	<i>Babesia</i> sp Coco	Desconhecido
Intermediário (2,66-2,03)	<i>Babesia negevi</i> n sp	Desconhecido (<i>Ornithodoros tholozani</i> é suspeito)
Pequenas (1,0-2,5 µm)	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> e <i>Haemaphysalis bispinosa</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ? <i>Haemaphysalis hystricis</i> ?
	<i>Babesia conradae</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
	<i>Babesia vulpes</i>	<i>Ixodes</i> spp, <i>Dermacentor reticulatus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> são suspeitos

De forma parecida, e com evidências mais contundentes, recentemente foi demonstrada, em cães do Taiwan, a transmissão transovariana de *Babesia gibsoni* no carrapato *Haemaphysalis hystricis*. O estudo almejava investigar a discrepância entre a predominância de Babesiose canina causada pela *Babesia gibsoni* e a ausência de seu carrapato vetor, *Haemaphysalis longicornis*, no país (Jongejan et al., 2018). Adicionalmente, a transmissão sanguínea de *Babesia gibsoni* durante briga de cães já foi amplamente documentada, especialmente no caso das raças American Pit Bull Terrier (Jefferies et al., 2007b; Cannon et al., 2016), Tosa inu (Birkenheuer et al., 2005) e American Staffordshire

Terrier (Birkenheuer et al., 2018). Transmissão transplacentária, mas não transmamária, também já foi reportada para esse mesma espécie de *Babesia* (Fukumoto et al., 2005). Transmissão vertical de *Babesia vulpes* (Simes et al., 2011) e *Babesia canis* (Boozer; Macintire, 2003) também já foram documentadas como possíveis .

No caso da Rangeliose, não foi observada infecção transplacentária em um animal gestante assintomático para a doença (Soares, 2014). O carrapato comprovadamente transmissor da doença é o *Amblyomma aureolatum* (Soares et al, 2018). No entanto, em estudo recente foi observado o parasitismo exclusivo por *Amblyomma ovale* em um canino positivo à PCR para *Rangelia vitalii* (Fournier et al., 2020). *Cerdocyon thous*, o cachorro-domato, é o canídeo selvagem mais provável de ser o reservatório da doença (Soares et al., 2014; da Silva, 2018; Souza et al., 2019).

Quanto a reservatórios das *Babesia* spp que acometem cães, o chacal-de-dorso-negro, espécie de canídeo encontrado na África, é considerado o hospedeiro natural para *Babesia rossi*, na África Sub-Saariana (Penzhorn et al., 2017; Penzhorn et al., 2020; Viljoen et al., 2021). Já para *Babesia conradae*, coiotes têm sido propostos como potenciais reservatórios (Di Cicco et al., 2012).

Acredita-se que o ciclo de vida das Babesias, como dito anteriormente, difere de outros piroplasmídeos como o *Cytauxzoon* sp e *Theileria* spp apenas no que tange à ausência de esquizogonia e em relação aos gametas, que não se diferenciam em micro e macrogametócitos, e são chamados de corpos de Strahlenkorper. O período de incubação das Babesias varia de 10 a 28 dias, dependendo da espécie envolvida. O ciclo biológico tem início com a inoculação, a partir do repasto sanguíneo do carrapato vetor, de esporozoítos de *Babesia* (Sz) na corrente sanguínea do hospedeiro. Após a invasão das hemácias, essas formas se diferenciam em trofozoítos (T), os quais se dividem assexuadamente (merogonia) em dois ou quatro merozoítos (M). Os merozoítos então saem das hemácias e invadem outras novas, continuando o ciclo de replicação no hospedeiro. Alguns merozoítos interrompem a divisão e se transformam em gamontes ou pré-gametócitos (G). Já no intestino do hospedeiro invertebrado, ocorre a diferenciação dos gamontes em gametas (conhecidos como Strahlenkorper – Sk). Segue então a fusão dos gametas, dando origem ao zigoto diploide (Z, gamogonia). Após sucessivas meioses desses zigotos há a formação dos oocinetos, zigotos móveis e haploides, que se multiplicam por esporogonia e ganham acesso à hemolinfa, onde

continuam sua invasão e replicação de vários tecidos do vetor, incluindo as glândulas salivares (Sg). Nessa fase há um ciclo final de multiplicação e diferenciação dos oocinetos em esporozoítos, que irão infectar um novo hospedeiro vertebrado a partir de novo repasto sanguíneo (Transmissão transestadial – Ts), ou ainda procede a Transmissão ovariana – To), na qual os oocinetos invadem os ovários e ovos do carrapato e esporozoítos infectantes são formados na glândula salivar da próxima geração de larvas (Figura 14).

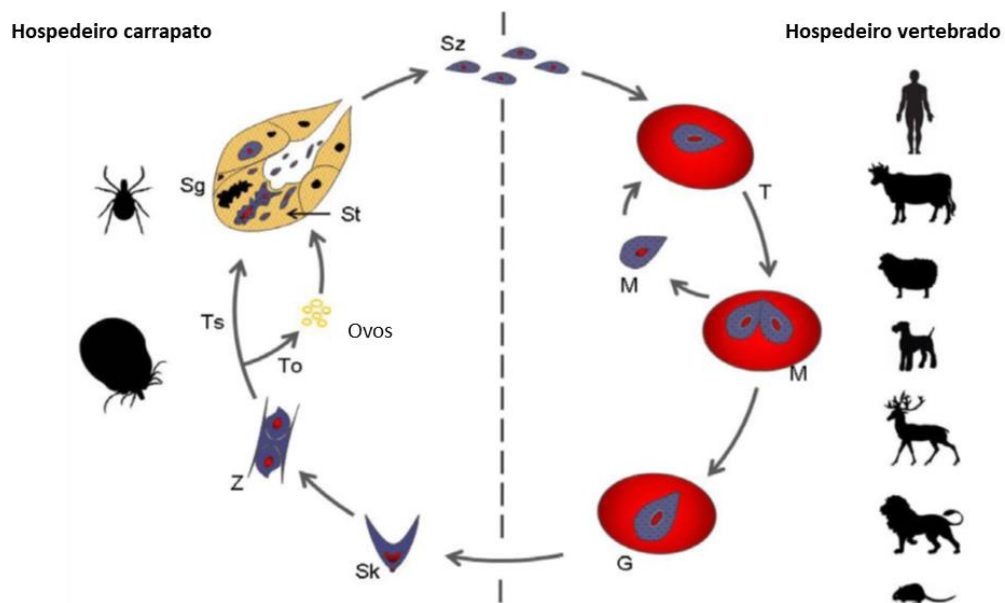


Figura 14: Ciclo de vida de *Babesia* spp (Adaptado de Schnittger et al., 2012)

Fonte: Mehlhorn and Schein, 1984

A Babesiose (considerando-se as espécies dos grupos das grandes *Babesias*) se caracteriza pelo parasitismo intra-eritrocitário restrito da *Babesia* spp (Boozer; Macintire, 2003), característica que a diferencia da *Rangelia vitalii* (Lopes et al, 2014) e das pequenas *Babesias*, nas quais os agentes apresentam uma fase pré-eritrocitária, parasitando também leucócitos (Solano-Gallego; Baneth, 2011). Adicionalmente e exclusivamente no caso da *Rangelia* ocorre também o parasitismo preponderante de células endoteliais de capilares sanguíneos (Loretti; Barros, 2005). Por fim, assim como as *Babesia* sensu strictu, na Rangeliose já foi demonstrada transmissão transestadial e transovariana (Soares, 2014).

2.7 Infecção, manifestações clínicas e achados histopatológicos

Com relação à infecção por *Theileria* spp, poucos estudos relatam a presença de animais sintomáticos, sendo febre, letargia, anemia, hemoglobinúria e icterícia os sinais mais comuns (Matjila et al., 2008; Beck et al., 2009; Díaz-Regañón et al., 2020).

Já manifestações clínicas das Babesioses são extremamente variáveis, variando de formas assintomáticas a hiperagudas fulminantes (Boozer; Macintire, 2003). A variação dos sinais clínicos durante o curso da doença depende muito da espécie que causa a infecção. A enfermidade é caracterizada por anemia hemolítica (intra e extravascular), trombocitopenia, fraqueza, esplenomegalia, linfadenomegalia, febre, podendo haver nas variantes mais patogênicas azotemia, hemoglobinúria, hepatopatia com icterícia, anormalidades eletrolíticas, anemia hemolítica imunomediada, azotemia, proteinúria, Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARS), Babesiose cerebral, pancreatite e até rabdomiólise (Köster et al, 2015; Pantchev et al, 2015; Solano-Gallego et al, 2016).

A patogênese multifatorial da Babesiose canina reflete o processo imunomediado que a doença pode causar no hospedeiro. Dessa forma, lesões oxidativas nas hemácias e uma resposta inflamatória sistêmica aguda podem ser secundárias ao parasitismo do agente infectante (Boozer; Macintire, 2003; Köster et al., 2015). Existe uma associação entre a concentração de Fator de Necrose Tumoral (TNF), a gravidade do quadro clínico e a parasitemia. TNF provavelmente desempenha um papel na produção de outras substâncias deletérias como o óxido nítrico ou radicais livres de oxigênio, os quais podem, subsequentemente, desencadear um processo de disfunção múltipla de órgãos (Köster et al., 2015).

A anemia, que pode ser regenerativa ou arregenerativa, e trombocitopenia, quando presente, variam de leve a acentuada (Bilić et al., 2018). Leucopenia com neutropenia e o aumento das proteínas de fase aguda são frequentemente identificadas (Dantas-Torres; Figueredo, 2006; Solano-Gallego et al., 2008), e o desvio à esquerda é relativamente comum (Köster et al., 2015). Aumento de ureia, creatinina, proteína C reativa, bilirrubinas, proteínas totais e diminuição da albumina também são descritas (Solano-Gallego et al., 2008).

A infecção por *Babesia vogeli* é a menos virulenta dentre as Babesias, provavelmente devido ao longo período de adaptação no hospedeiro canino. Entretanto,

pode ocorrer anemia acentuada em cães filhotes (Irwin, 2009) (Köster et al., 2015)(Mittal et al., 2019). Alterações clínico-patológicas comuns incluem anemia hemolítica ou não regenerativa, leucocitose, leucopenia e trombocitopenia (Solano-Gallego et al., 2016), mas animais assintomáticos e sem alterações nos exames laboratoriais também são descritos (Schnittger et al., 2012; Di Cataldo et al., 2020).

Além das alterações hematológicas já descritas para a *Babesia vogeli*, *Babesia canis* pode cursar com quadro clínico mais grave, incluindo anormalidades como petéquias, epistaxe, vômito, icterícia, hipotensão, alterações nas enzimas de lesão hepática, distúrbios eletrolíticos como hipocalcemia, hiponatremia e hiperfosfatemia, além de azotemia pré-renal ou renal (Solano-Gallego et al., 2016). Babesiose cerebral, edema pulmonar e necrose muscular já foram descritas, apesar de serem incomuns (Boozer; Macintire, 2003). Interessantemente, um estudo recente sugeriu o desencadeamento de uma patologia particular para a perpetuação da infecção por *Babesia canis* em cães domésticos. Partindo da hipótese de que deveria haver algum outro mecanismo responsável pela consolidação do sequestro do parasita, foi proposto um modelo esquemático com principais eventos-chave que estariam envolvidos na persistência do parasita no hospedeiro, caracterizando a infecção crônica (Figura 15).

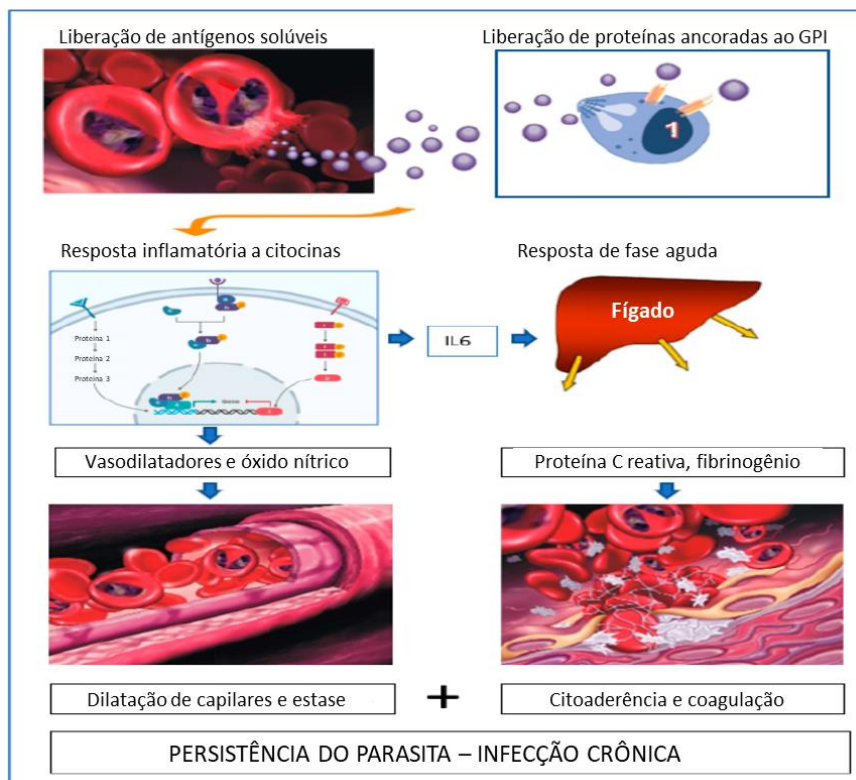


Figura 15: Representação esquemática dos eventos responsáveis pela persistência de *Babesia canis* em seu hospedeiro. (Adaptado de Schetters, 2019)

Nesse esquema, os antígenos solúveis excretados por *Babesia canis* em eritrócitos ou liberados da superfície do parasita provocam uma resposta inflamatória que leva à geração de componentes vasodilatadores. Como resultado, os capilares dilatam-se e o fluxo sanguíneo é diminuído. Adicionalmente, a citocina pró-inflamatória IL-6 é produzida, e estimula os hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda como o fibrinogênio. Devido à redução no fluxo sanguíneo, a propensão das hemácias infectadas de se aderirem à parede capilar é aumentada. A ativação do Sistema de coagulação leva à conversão de fibrinogênio em fibrina e à formação de coágulos sanguíneos com o aprisionamento dos eritrócitos infectados. Os parasitas proliferam-se nesses coágulos, perpetuando a infecção. Esse modelo justificaria, por exemplo, o fato de que *Babesia canis* frequentemente causa sinais clínicos graves, porém com poucos parasitas detectados na circulação sanguínea (Schetters, 2019).

Considerada a mais virulenta *Babesia* spp. que infecta cães domésticos, *Babesia rossi* causa doença aguda e hiperaguda, com manifestações clínicas como hepatopatias, doença renal aguda, babesiose cerebral, pancreatite, rabdomiólise, hemoconcentração relativa (“red biliary”), síndrome de estresse respiratório agudo e disfunção miocárdica (Bilić et al., 2018). Fatores de risco para o aumento da mortalidade relatados são desvio à esquerda de neutrófilos, colapso à apresentação inicial, presença de sinais cerebrais, hipoglicemia, hiperlactatemia, azotemia, hiperbilirrubinemia, hipercortisolemia, baixa concentração de tiroxina e hemoconcentração (Penzhorn, 2011). A patogenia da hemoconcentração não é compreendida, mas não é relacionada à simples desidratação. Ela é sempre acompanhada de falência múltipla de órgãos, e, conseqüentemente, provavelmente representa uma hemoconcentração relativa devido à perda de plasma para um endotélio excessivamente permeável. Já para a anemia, além da causa hemolítica, outros mecanismos como a diminuição da produção de células vermelhas secundária à hipoplasia eritroide induzida por inflamação e deseritropoiese (Leisewitz et al., 2019).

Em contrapartida à alta virulência conhecida de *Babesia rossi*, estudo recente relatou casos de animais infectados com caráter assintomático ou apresentando apenas sinais leves da infecção. Essa observação fez com que os autores do estudo sugerissem que a imunidade ao parasita seria adquirida por infecções repetidas e transitórias, o que levaria à

consideração cuidadosa do controle do carrapato-vetor em regiões endêmicas para esse piroplasmídeo (Morters et al., 2020).

Babesia gibsoni pode apresentar sintomatologia variável, desde infecções assintomática a casos de anemia hemolítica grave e trombocitopenia (Birkenheuer et al., 1999). Manifestações clínicas como letargia, febre e mucosas pálidas (Meinkoth et al., 2002), além de icterícia, linfonodomegalia, esplenomegalia e perda de peso são comuns (Solano-Gallego; Baneth, 2011). Menos comumente, pancreatite (Masuda et al., 2019), hipoalbuminemia, proteinúria e azotemia podem ocorrer (Ullal et al., 2018). No Brasil os poucos casos já relatados apresentaram, em parte, infecções inaparentes ou não relacionadas à infecção clássica, além de co-infecções por outras doenças potencialmente patogênicas como Erliquiose Monocítica Canina e Micoplasmose, o que pode confundir o quadro clínico do agente isoladamente (Trapp et al., 2006b).

Sinais clínicos de *Babesia gibsoni* são similares aos da *Babesia conradae* (Kjemtrup et al., 2006; Solano-Gallego; Baneth, 2011; Di Cicco et al., 2012; Dear et al., 2018), entretanto algumas infecções dessa última podem ser mais patogênicas, resultando em uma maior parasitemia e anemia mais grave que a primeira (Kjemtrup; Conrad, 2006). *Babesia vulpes* também se assemelha clinicamente às outras pequenas Babesias, porém a azotemia, pré-renal ou renal, aparenta ser mais comum na infecção por essa espécie (Solano-Gallego et al., 2016). Outros achados incluem taquicardia, taquipneia, hiperglobulinemia e cilindrúria (Solano-Gallego; Baneth, 2011; Barash et al., 2019).

A Rangeliose caracteriza-se por quadros hemolíticos e hemorrágicos como icterícia, epistaxe, hemoptise, sangramento bilateral na ponta das orelhas (considerado patognomônico da Rangeliose) - figura 16, além de anorexia, emaciação e depressão (Gottlieb et al., 2016). Anemia regenerativa hemolítica com esferocitose, presença de metarrubricitos (Lemos et al., 2017), exclusivamente extravascular (Lopes et al., 2014), - ao contrário da Babesiose, em que geralmente ocorre hemólise intra e extravascular - e elevações das enzimas hepáticas séricas como ALT e AST são manifestações típicas da enfermidade. Também diferentemente de *Babesia vogeli*, os níveis de ureia e creatinina não se encontram elevados na Rangeliose, provavelmente devido à ausência de hemoglobínúria (Costa et al., 2012). Ademais, a anemia na Rangeliose tende a ser mais profunda que na infecção por *Babesia vogeli*, assim como a trombocitopenia também costuma ser mais acentuada, provavelmente

devido ao consumo de plaquetas pela vasculite, justificando a frequente presença de macroplaquetas na circulação sanguínea (Paim et al., 2011).



Figura 16: Cão infectado por *Rangelia vitalii* apresentando mucosa pálida e sangramento em ponta de orelha. (França et al., 2010).

Alterações *pos-mortem* refletem a hemólise extravascular que caracteriza a doença. Dessa forma, mucosas ictéricas de pele, esclera, periósteo e até da cápsula articular podem ser observadas. Na análise histopatológica, órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea apresentam na geral hiperplasia e inflamação mononuclear, predominantemente plasmocitária, e zoítos de *R. vitalii* podem ser encontrados nos capilares endoteliais (Figuera et al., 2010).

2.8 Diagnóstico

De forma semelhante aos piroplasmídeos de gatos, para o diagnóstico desses parasitas em cães é recomendada uma abordagem integrativa baseada nas manifestações clínicas e exame do esfregaço sanguíneo à microscopia, além de testes sorológicos e moleculares – Figura 17 (Solano-Gallego et al, 2016; Bilic´ et al, 2018).

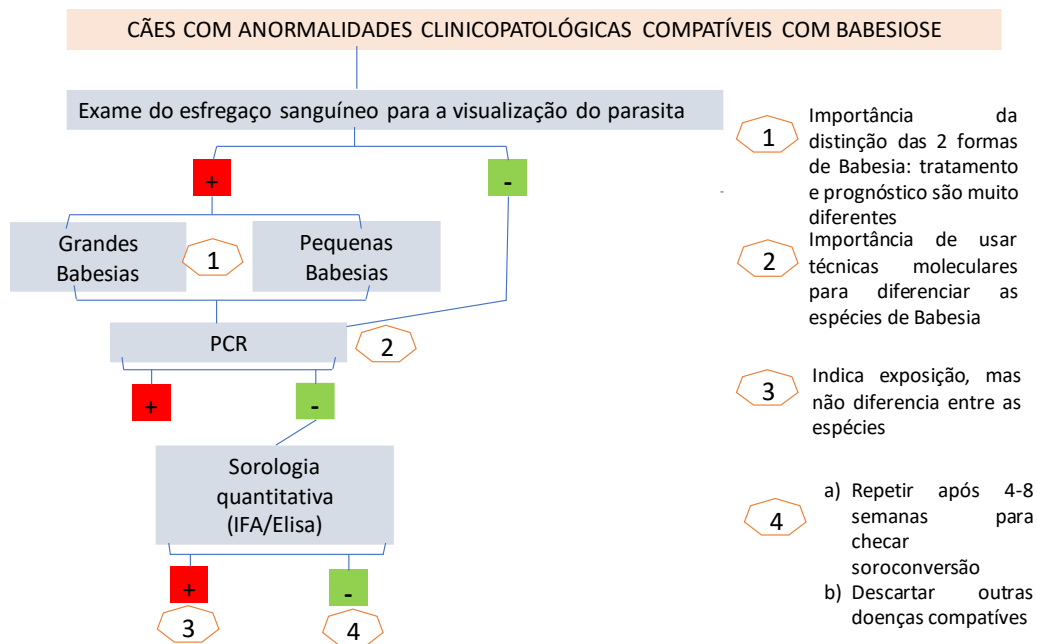


Figura 17: Algoritmo para o diagnóstico da Babesiose canina (Adaptado de Solano-Gallego et al, 2016).

A avaliação microscópica é a ferramenta diagnóstica mais acessível e mais fácil de se realizar, no entanto a sensibilidade desse método é baixa, e depende também da espécie envolvida, já que as pequenas *Babesia* spp. são mais difíceis de serem visualizadas que as grandes (Solano-Gallego et al, 2016). Além disso, animais clinicamente afetados nem sempre apresentam organismos visíveis nos esfregaços sanguíneos, e baixos níveis de parasitemia são comuns até mesmo em infecções patentes. Para contrapor isso, a análise do tampão leucocitário ou de esfregaços sanguíneos feitos a partir de sangue capilar podem aumentar a detecção do parasita (Boozer; Macintire, 2003). A forma tetrade, também conhecida como cruz-de-malta, pode estar presente nos casos de infecção por *Theileria* spp mas também nas espécies *Babesia conradae* e *Babesia negevi* n.sp (Baneth et al., 2020). O quadro 11 apresenta as principais características morfológicas das principais *Babesia* spp que acometem cães domésticos.

Quadro 11: Caracterização morfológica à microscopia óptica das principais *Babesia* spp. causadoras de enfermidades em cães domésticos.

Espécie de Babesia	Dimensões	Tamanho (µm)	Morfologia
<i>Babesia vogeli</i>	grande	2,5 x 4,5	Formato piriforme, única ou em par
<i>Babesia canis</i>	grande	2,0 x 5,0	Formato piriforme, geralmente em par
<i>Babesia rossi</i>	grande	2 x 5,0	Formato piriforme, geralmente em par
<i>Babesia gibsoni</i>	pequena	1,0 x 3,0	Geralmente única
<i>Babesia conradae</i>	pequena	2,2 x 1,85	Formato de anel, piriforme, anaplasmoide, ameboide e tétrede
<i>Babesia vulpes</i>	pequena	1,33 x 0,98	Formato de anel ou oval

Fontes: (Kjemtrup et al., 2006; Solano-Gallego and Baneth, 2011; Baneth et al., 2019)

Já para o diagnóstico morfológico da Rangeliose, através da pesquisa do parasita em esfregaço sanguíneo, a observação de protozoário intracelular não só em hemácias, mas principalmente em neutrófilos e monócitos deve levar à suspeita da doença (Paim et al, 2011; Soares et al, 2011). (Figura 18)

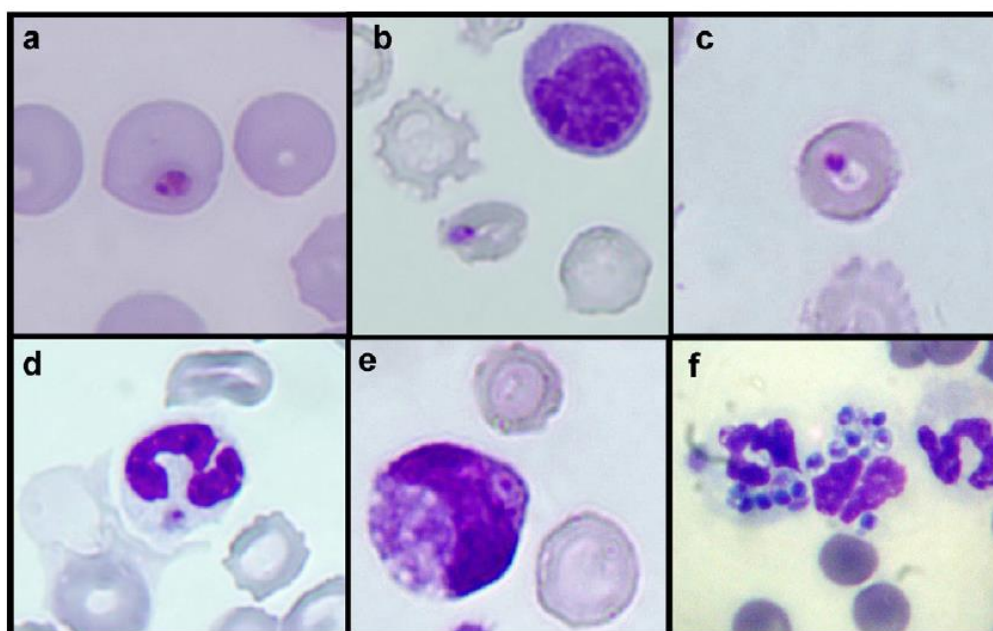


Figura 18: *Rangelia vitalii* encontrada em esfregaços sanguíneos de cães infectados. Formas individuais dentro de hemácias (a-c), neutrófilos (d), monócitos (e) e múltiplas formas dentro de neutrófilos. (Soares et al, 2011).

Testes sorológicos são úteis para se detectar cães portadores assintomáticos e para o diagnóstico de infecções crônicas, nos quais a parasitemia pode ser baixa e, portanto, indetectável nos esfregaços sanguíneos de sangue periférico. Entretanto é importante ressaltar que, mesmo após o tratamento, os animais permanecem soropositivos por longo

período, fato que diminui o valor diagnóstico naqueles sem manifestações clínicas da doença (Dantas-Torres; Figueredo, 2006). O teste de imunofluorescência Indireta (IFI) tem sido amplamente utilizado para fins diagnósticos, enquanto o ELISA é mais usado para pesquisa e inquéritos epidemiológicos (Bilic' et al, 2018). Reações cruzadas de Babesias com outras doenças comuns em áreas tropicais, como Leishmaniose Visceral ou Erliquiose Monocítica Canina, não têm sido relatadas, mas sim a possibilidade de coinfeção em áreas endêmicas para essas enfermidades (Oliveira et al., 2008; Krawczak et al., 2015). Por outro lado, ocorrem reações cruzadas entre as diferentes espécies de *Babesia*, especialmente nas espécies mais próximas filogeneticamente, provavelmente devido ao compartilhamento de antígenos imunodominantes comuns ou similares entre elas (Birkenheuer et al., 2003). Vale ressaltar também que a maioria dos testes sorológicos detectam anticorpos contra as grandes Babesias, portanto, quando há suspeita de infecção por *Babesia gibsoni*, por exemplo, a amostra deve ser testada especificamente com anticorpos anti *B. gibsoni* (Irizarry-Rovira et al., 2001).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica diagnóstica sensível e específica que é frequentemente empregada para o diagnóstico das Babesioses (Solano-Gallego; Baneth, 2011; Annoscia et al., 2017) . Devido ao caráter conservativo do gene 18S rRNA entre as Babesias, ele é o gene mais comumente utilizado para PCR convencional (Jefferies et al., 2007a). No entanto, a identificação e diferenciação entre as espécies de *Babesia* já foi realizada também nos genes 5.8S e 28S (Irwin, 2009), mt (mitochondrial) DNA (Qurollo et al., 2017), além das regiões ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*) (Zahler et al., 1998). Ademais, outras técnicas como RFLP PCR (Jefferies et al., 2007a; Solano-Gallego et al, 2008), Nested PCR (Birkenheuer et al, 2003) e qPCR (Rembeck et al., 2012), também foram utilizadas com êxito para o diagnóstico diferencial das Babesias. Outras técnicas recentemente descritas incluem a amplificação isotérmica, ou LAMP (Adaszek et al., 2013; Cooke et al., 2018) ou testes point-of-care (Liu et al., 2019), que prometem agilidade nos resultados.

Em estudo comparando-se as técnicas sorológicas com as moleculares, observou-se alta correlação, principalmente em animais sintomáticos, quando do uso concomitante das duas técnicas, com respeito ao diagnóstico das Babesioses. A associação dessas duas metodologias diagnósticas permitiu o incremento da detecção de infecção ou exposição ao agente em até 50% (Maggi et al., 2013). A combinação de painéis moleculares e sorológicos

pode aumentar a sensibilidade diagnóstica para detecção de infecções agudas e crônicas, respectivamente (Kidd, 2019).

O diagnóstico da Rangeliose em um animal vivo é baseado nos sinais, alterações hematológicas compatíveis (Loretti; Barros, 2005) e análise molecular pela PCR tendo como alvo o gene 18SrRNA (Paim et al, 2016) ou hsp 70 de *Babesia* spp (Yamasaki et al., 2007). A confirmação diagnóstica é realizada após o sequenciamento da sequência amplificada (Soares et al, 2011; Lopes et al, 2014).

2.9 Tratamento

As drogas empregadas no tratamento das Babesioses têm recomendação mediante a espécie envolvida. Dessa forma, o Dipropionato de Imidocarb é o tratamento de eleição para a Babesiose canina causada pelas grandes Babesias (Bilic' et al, 2018), especialmente no Brasil, onde é recomendada a dose de 5 – 7 mg/kg via subcutânea ou intramuscular, total de duas doses com intervalo de quinze dias, com boa resposta (Brandão et al., 2003). Já para casos de pequenas Babesias o emprego de outras medicações ou a associação entre drogas é realizado com eficácia boa a moderada. No caso de *Babesia vulpes* recomenda-se a associação de Azitromicina com Atovaquona ou Buparvaquona (Nayyar Ghauri et al., 2019), assim como a Clindamicina e Atovaquona para *Babesia gibsoni* (Solano-Gallego et al, 2016). Uma das explicações para a pior resposta ao tratamento das pequenas Babesias como a *B. gibsoni* pode ser a presença de mutação nos genes *Cytb* do protozoário, o que confere resistência à Atovaquona e consequente falha no tratamento (Birkenheuer et al., 2018).

Os maiores desafios são referentes ao tratamento das pequenas Babesias, que frequentemente não são eliminadas mesmo após tratamento. Portanto, cães tratados podem permanecer como carreadores crônicos capazes de transmitir a infecção posteriormente, podendo ocorrer recidiva do quadro clínico. Devido a isso, recomenda-se que animais tratados sejam acompanhados e monitorados quanto à persistência da infecção e da parasitemia, através do exame de esfregaço sanguíneo e PCR (Baneth, 2018).

No caso da Rangeliose, as terapias indicadas se assemelham àquela usada no tratamento das grandes Babesias, com o uso do Dipropionato de Imidocarb e do Aceturato de Diminazeno, associados à medidas de suporte (Loretti; Barros, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamu, M., Troskie, M., Oshadu, D.O., Malatji, D.P., Penzhorn, B.L., Matjila, P.T., 2014. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. *Parasites and Vectors* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-119>
- Adaszek, L., Winiarczyk, S., 2008. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 152, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.024>
- Adaszek, J. M., Kalinowski, M.; Banach, T., Wulupek, D., Winiarczyk, S., 2013. The loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Babesia canis canis* infections in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 131–133. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0020>
- Akram, I.N., Parveen, T., Abrar, A., Mehmood, A.K., Iqbal, F., 2019. Molecular detection of babesia microti in dogs and cat blood samples collected from punjab (Pakistan). *Trop. Biomed.* 36, 304–309.
- Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Ipek, N.D.S., Balkaya, I., Utuk, A.E., Klrbas, A., Şimsek, S., DumanII, N., 2015. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites and Vectors* 8, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0763-z>
- Alho, A.M., Silva, J., Fonseca, M.J., Santos, F., Nunes, C., De Carvalho, L.M., Rodrigues, M., Cardoso, L., 2016. First report of *Cytauxzoon* sp. infection in a domestic cat from Portugal. *Parasites and Vectors* 9, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1506-5>
- Alho, A.M., Lima, C., Latrofa, M.S., Colella, V., Ravagnan, S., Capelli, G., Madeira De Carvalho, L., Cardoso, L., Otranto, D., 2017. Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar. *Parasites and Vectors* 10, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2237-y>
- Allen, K.E., Thomas, J.E., Wohltjen, M.L., Reichard, M. V., 2019. Transmission of

- Cytauxzoon felis to domestic cats by Amblyomma americanum nymphs. *Parasites and Vectors* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3276-8>
- Allison, R.W., Yeagley, T.J., Levis, K., Reichard, M. V., 2011. Babesia canis rossi infection in a Texas dog. *Vet. Clin. Pathol.* 40, 345–350. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00332.x>
- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., Millán, J., 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and Vectors* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>
- Amici, R.R., 2001. The history of Italian parasitology. *Vet. Parasitol.* 98, 3–30.
- André, M.R., Adania, C.H., Machado, R.Z., Allegrettl, S.M., Fellppe, P.A.N., Silva, K.F., Nakaghi, A.C.H., Dagnone, A.S., 2009. Molecular detection of cytauxzoon spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. *J. Wildl. Dis.* 45, 234–237. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.234>
- André, M.R., Adania, C.H., Hidalgo, R., Teixeira, F., Silmara, D.V.M., Allegretti, M., Machado, R.Z., 2011. MOLECULAR AND SEROLOGICAL DETECTION OF BABESIA SPP. IN NEOTROPICAL AND EXOTIC CARNIVORES IN BRAZILIAN ZOOS.
- André, M.R., Baccharim Denardi, N.C., Marques de Sousa, K.C., Gonçalves, L.R., Henrique, P.C., Grosse Rossi Ontivero, C.R., Lima Gonzalez, I.H., Cabral Nery, C.V., Fernandes Chagas, C.R., Monticelli, C., Alexandre de Santis, A.C.G., Machado, R.Z., 2014. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>
- André, M.R., Herrera, H.M., de Jesus Fernandes, S., de Sousa, K.C.M., Gonçalves, L.R., Domingos, I.H., de Macedo, G.C., Machado, R.Z., 2015. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>
- Annoscia, G., Cantacessi, C., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Otranto, D., Olivieri, E., Manfredi, M.T., 2017. A new PCR assay for the detection and differentiation of

- Babesia canis* and *Babesia vogeli*. Ticks Tick. Borne. Dis.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.002>
- Aschenbroich SA, Rech RR, Sousa RS, Carmichael KP, S.K., 2012. Pathology in practice. Cytauxzoon felis infection. Vet Med Today Pathol. Pract. JAVMA 240, 159–161.
- Augustine, S., Sabu, L., Lakshmanan, B., 2017. Molecular identification of *Babesia* spp. in naturally infected dogs of Kerala, South India. J. Parasit. Dis. 41, 459–462.
<https://doi.org/10.1007/s12639-016-0827-9>
- Ayoob, A.L., Prittie, J., Hackner, S.G., 2010. Feline babesiosis. J. Vet. Emerg. Crit. Care 20, 90–97. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00493.x>
- Baneth, G., Kenny, M.J., Anug, Y., Shkap, V., Levy, A., Shaw, S.E., 2004. Infection with a Proposed New Subspecies of. J. Clin. Microbiol. 42, 99–105.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.99>
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L., 2015. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. Parasites and Vectors 8, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0830-5>
- Baneth, G., 2018. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. Vet. Parasitol. 254, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.001>
- Baneth, G., Cardoso, L., Brilhante-Simões, P., Schnittger, L., 2019. Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. Parasites and Vectors 12, 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3385-z>
- Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Birkenheuer, A.J., Schreeg, M.E., Prince, H., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., Aroch, I., 2020. A new piroplasmid species infecting dogs: Morphological and molecular characterization and pathogeny of *Babesia negevi* n. sp. Parasites and Vectors 13, 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-3995-5>
- Barandika, J.F., Espí, A., Oporto, B., Del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., García-Pérez, A.L., Hurtado, A., 2016. Occurrence and genetic diversity of piroplasms and other apicomplexa in wild carnivores. Parasitol. Open 2, 1–7.
<https://doi.org/10.1017/pao.2016.4>

- Barash, N.R., Thomas, B., Birkenheuer, A.J., Breitschwerdt, E.B., Lemler, E., Quorollo, B.A., 2019. Prevalence of *Babesia* spp. and clinical characteristics of *Babesia vulpes* infections in North American dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 2075–2081. <https://doi.org/10.1111/jvim.15560>
- Barbosa, C.O.S., Garcia, J.R., Fava, M.N., Pereira, D.A., da Cunha, M.J.R., Nachum-Biala, Y., Cury, M.C., Baneth, G., 2020. Babesiosis caused by *Babesia vogeli* in dogs from Uberlândia State of Minas Gerais, Brazil. *Parasitol. Res.* 119, 1173–1176. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06515-3>
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* 39, 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.12.005>
- Bigdeli, M., Rafie, S.M., Namavari, M.M., Jamshidi, S., 2012. Report of *Theileria annulata* and *Babesia canis* infections in dogs. *Comp. Clin. Path.* 21, 375–377. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1505-7>
- Bilić, P., Kuleš, J., Barić Rafaj, R., Mrljak, V., 2018. Canine babesiosis: Where do we stand? *Acta Vet. Brno.* 68, 127–160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>
- Birkenheuer, A., Levy, M., Savary, K., Gager, R., Breitschwerdt, E., 1999. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 125–128. <https://doi.org/10.5326/15473317-35-2-125>
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Stebbins, M., Poore, M., Breitschwerdt, E., 2003. Serosurvey of Anti *Babesia* Antibodies in Stray Dogs and American Pit Bull Terriers and American Staffordshire Terriers. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 39, 551–557.
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2004. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet. Parasitol.* 124, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.008>
- Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 Cases (2000-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 942–947. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.942>

- Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006a. Cytauxzoon felis infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 Cases (1998-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568–571.
<https://doi.org/10.2460/javma.228.4.568>
- Birkenheuer, A.J., Marr, H., Alleman, A.R., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006b. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Vet. Parasitol.* 137, 144–149.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.007>
- Birkenheuer, A.J., Marr, H.S., Warren, C., Acton, A.E., Mucker, E.M., Humphreys, J.G., Tucker, M.D., 2008. *Cytauxzoon felis* infections are present in bobcats (*Lynx rufus*) in a region where cytauxzoonosis is not recognized in domestic cats. *Vet. Parasitol.* 153, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.020>
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2017. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype ... Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172>
- Birkenheuer, A.J., Marr, H.S., Wilson, J.M., Breitschwerdt, E.B., Quorllo, B.A., 2018. *Babesia gibsoni* cytochrome b mutations in canine blood samples submitted to a US veterinary diagnostic laboratory. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 1965–1969.
<https://doi.org/10.1111/jvim.15300>
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Kocan, K.M., Hair, J., 1987. Evidence of a limited schizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *J. Wildl. Dis.* 23, 499–501. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.3.499>
- Bondy, P.J., Cohn, L.A., Tyler, J.W., Marsh, A.E., 2005. Polymerase chain reaction detection of *Cytauxzoon felis* from field-collected ticks and sequence analysis of the small subunit and internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal RNA gene. *J. Parasitol.* 91, 458–461. <https://doi.org/10.1645/GE-374R>
- Boozer, A.L., Macintire, D.K., 2003. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 885–904, viii. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00039-1)

- Borrás, P., Salvador, F., Rinaldi, V., Armitano, R., Farber, M., Sanchez, R., Mori, L., Guillemi, E., 2020. Use of molecular tools for the diagnosis of rangelirosis by *Rangelia vitalii* in Argentina: A case report. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 21, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100426>
- Bosman, A.M., Venter, E.H., Penzhorn, B.L., 2007. Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. *Vet. Parasitol.* 144, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.025>
- Bosman, A.M., Oosthuizen, M.C., Peirce, M.A., Venter, E.H., Penzhorn, B.L., 2010. *Babesia lengau* sp. nov., a novel *Babesia* species in Cheetah (*Acinonyx jubatus*, Schreber, 1775) populations in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2703–2708. <https://doi.org/10.1128/JCM.02266-09>
- Bosman, A.M., Oosthuizen, M.C., Venter, E.H., Steyl, J.C., Gous, T.A., Penzhorn, B.L., 2013. *Babesia lengau* associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats. *Parasites and Vectors* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-128>
- Bosman, A.M., Penzhorn, B.L., Brayton, K.A., Schoeman, T., Oosthuizen, M.C., 2019. A novel *Babesia* sp. associated with clinical signs of babesiosis in domestic cats in South Africa. *Parasites and Vectors* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3395-x>
- Brandão, L.P., Hagiwara, M.K., Myiashiro, S.I., 2003. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Vet. Parasitol.* 114, 253–265. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00130-4)
- Brilhante Simões, P., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2011. Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission, *Parasites & Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-50>
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O., Peterson, D.S., 2008. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. *J Vet Diagn Invest* 20, 485–488.

- Brown, Holly M, Berghaus, R.D., Latimer, K.S., Britt, J.O., Rakich, P.M., Peterson, D.S., 2009a. Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia.
- Brown, Holly M, Modaresi, S.M., Cook, J.L., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2009b. Genetic variability of archived *Cytauxzoon felis* histologic specimens from domestic cats in Georgia , 1995 – 2007. *J Vet Diagn Invest* 21, 493–498.
- Brown, H.M., Lockhart, J.M., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2010. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. *Vet. Parasitol.* 172, 311–316.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.041>
- Camacho, A.T., Guitián, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Goethert, H.K., Telford, S.R., 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet. Rec.* 149, 552–555. <https://doi.org/10.1136/vr.149.18.552>
- Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A. S., Goethert,H.K., Telford, S.R., 2004. Azotemia and Mortality among *Babesia microti*-Like Infected Dogs. *J Vet Intern Med* 18, 141–146.
- Camacho, A., Guitian, J., Pallas, E., Gestal, J., Olmeda, S., Goethert, H., Telford, S., Spielman, A., 2005. Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. *Vet. Res.* 36, 713–722. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Cannon, S.H., Levy, J.K., Kirk, S.K., Crawford, P.C., Leutenegger, C.M., Shuster, J.J., Chandrashekar, R., Program, S.M., Sacramento, W., 2016. Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. *Vet J.* 211, 64–69.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.02.012>.Infectious
- Cardoso, L., Costa, Á., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156, 199–204.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.027>
- Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., Furlanello, T., Millotti, A., Caldin, M., Solano-Gallego, L., 2012. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Vet. Parasitol.* 183, 343–352.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.025>

- Carli, E., Trotta, M., Bianchi, E., Furlanello, T., Caldin, M., Pietrobelli, M., Solano-Gallego, L., 2014. Cytauxzoon sp. infection in two free ranging young cats: clinicopathological findings, therapy and follow up. *Turkiye Parazitol. Derg.* 38, 185–189. <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3540>
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis voaeli*, *Babesia canis rossi*: *Society* 46, 298–303.
- Cassini, R., Zanutto, S., di Regalbono, A.F., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.044>
- Castro, V.V., Ayres, E. da C.B.S., Canei, D.H., Pereira, M.E., Sousa, V.R.F., Chitarra, C.S., Dutra, V., Nakazato, L., de Almeida, A.D.B.P.F., 2020. Molecular prevalence and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil. *Cienc. Rural* 50, 0–5. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190389>
- Checa, R., Montoya, A., Ortega, N., González-Fraga, J.L., Bartolomé, A., Gálvez, R., Marino, V., Miró, G., 2017. Efficacy, safety and tolerance of imidocarb dipropionate versus atovaquone or buparvaquone plus azithromycin used to treat sick dogs naturally infected with the *Babesia microti*-like piroplasm. *Parasites and Vectors* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2049-0>
- Clarke, L.L., Rissi, D.R., 2015. Neuropathology of Natural *Cytauxzoon felis* Infection in Domestic Cats. *Vet. Pathol.* 52, 1167–1171. <https://doi.org/10.1177/0300985814564986>
- Clarke, L.L., Krimer, P.M., Rissi, D.R., 2017. Glial Changes and Evidence for Apoptosis in the Brain of Cats Infected by *Cytauxzoon felis*. *J. Comp. Pathol.* 156, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.11.268>
- Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., Brunker, J.D., Ratcliff, E. R., 2011. Efficacy of Atovaquone and Azithromycin or Imidocarb Dipropionate in Cats with Acute *Cytauxzoonosis*. *J. Vet Intern Med* 5325, 55–60.

- Cohn, L.A., Shaw, D., Shoemake, C., Birkenheuer, A.J., 2020. Second illness due to subsequent *Cytauxzoon felis* infection in a domestic cat. *J. Feline Med. Surg. Open Reports* 6, 1–5. <https://doi.org/10.1177/2055116920908963>
- Collett, M.G., 2000. Survey of canine babesiosis in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71, 180–186. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.710>
- Conner, B.J., Hanel, R.M., Brooks, M.B., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., 2015. Coagulation abnormalities in 5 cats with naturally occurring cytauxzoonosis. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 25, 538–545. <https://doi.org/10.1111/vec.12326>
- Cooke, K.L., Frenzer, P., Tucker, S.J., Crawford, P.C., Kirk, S.K., Levy, J.K., 2018. Rapid Diagnosis of *Babesia gibsoni* by Point-of-Need Testing by Insulated Isothermal PCR in Dogs at High Risk of Infection. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 232–235. <https://doi.org/10.1111/jvim.15033>
- Copat, B., Bastiani, P.V., Castellarin Jaconi, F., Wallyson Damarem, W., Streck, A.F., de Oliveira, E.C., Sonne, L., França, R.T., 2019. Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangelirosis in *Cerdocyon thous*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 690–693. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.010>
- Costa-Júnior, L.M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2009. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Res. Vet. Sci.* 86, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.002>
- Costa-Júnior, L.M., Zahler-Rinder, M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2012. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 188, 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.015>
- Costa, A.P. da, Costa, F.B., Labruna, M.B., Silveira, I., Moraes-Filho, J., Soares, J.F., Spolidorio, M.G., Guerra, R. de M.S.N. de C., 2015. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 24, 28–

35. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612015008>

Costa, M.M., França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, C.B., Paim, F., Amaral, C.H. do, Dornelles, G.L., Cunha, J.P.M.C.M. da, Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M.A., Monteiro, S.G., Lopes, S.T. dos A., 2012. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 21, 243–248.

<https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000300012>

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003a. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* 114, 173–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00141-9)

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003b. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: A molecular study. *Vet. Microbiol.* 93, 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0)

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003c. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00078-5)

Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The “expanding universe” of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.015>

Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J., 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet. Parasitol.* 142, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.004>

Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R., Irwin, P., 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasitol.* 144, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.042>

- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73–76.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.012>
- da Silva, M.R.. at al, 2018. *Rangelia vitalii* and *Hepatozoon canis* coinfection in pampas fox *Lycalopex gymnocercus* from Santa Catarina State , Brazil. *Brazilian J. Vet. Parasitol.* 27, 377–383.
- Da Silva, V.C.L., De Lima, E.R., De Melo Colaço Dias, M.B., Fukahori, F.L.P., De Azevedo Rêgo, M.S., Júnior, J.W.P., De Cássia Peixoto Kim, P., Leitão, R.S.C.S., Mota, R.A., De Oliveira Carieli, E.P., 2016. Parasitological and molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs of Recife, Pernambuco and evaluation of risk factors associated. *Semin. Agrar.* 37, 163–172. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p163>
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., 2006. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Vet. Parasitol.* 141, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2015. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Vet. Hung.* 63, 199–208. <https://doi.org/10.1556/AVet.2015.017>
- De Lorenzo, C., Bianchi, M.V., Ehlers, L.P., Vielmo, A., Pereira, P.R., de Almeida, B.A., de Andrade, C.P., Girotto-Soares, A., Pavarini, S.P., Driemeier, D., Soares, J.F., Sonne, L., 2021. *Rangelia vitalii* molecular and histological quantification in tissues comparing crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and domestic dogs. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 12. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101731>
- de Quadros, R., et al, 2015. Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii* , the Agent of Canine Rangeliosis. *J. Wildl. Dis.* 51, 787–789. <https://doi.org/10.7589/2014-08-194>
- de Sousa, K.C.M., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Freschi, C.R., Machado, R.Z., André, M.R., 2018. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 245–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.010>

- Dear, J.D., Owens, S.D., Lindsay, L.A.L., Biondo, A.W., Chomel, B.B., Marcondes, M., Sykes, J.E., 2018. Babesia conradae infection in coyote hunting dogs infected with multiple blood-borne pathogens. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 1609–1617. <https://doi.org/10.1111/jvim.15233>
- Defauw, P., Schoeman, J.P., Leisewitz, A.L., Goddard, A., Duchateau, L., Aresu, L., Meyer, E., Daminet, S., 2020. Evaluation of acute kidney injury in dogs with complicated or uncomplicated Babesia rossi infection. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101406. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101406>
- Di Cataldo, S., Ulloa-Contreras, C., Cevidanes, A., Hernández, C., Millán, J., 2020. Babesia vogeli in dogs in Chile. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 2296–2299. <https://doi.org/10.1111/tbed.13609>
- Di Cicco, M.F., Downey, M.E., Beeler, E., Marr, H., Cyrog, P., Kidd, L., Diniz, P.P.V.P., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., 2012. Re-emergence of Babesia conradae and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin. *Vet. Parasitol.* 187, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.006>
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-Bueno, L., García-Sancho, M., Agulla, B., Sainz, Á., 2017. Molecular detection of Hepatozoon spp. and Cytauxzoon sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasites and Vectors* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2056-1>
- Díaz-Regañón, D., Agulla, B., Piya, B., Fernández-Ruiz, N., Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Sainz, Á., 2020. Stray dogs in Nepal have high prevalence of vector-borne pathogens: A molecular survey. *Parasites and Vectors* 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04057-7>
- Do, T., Kamyngkird, K., Chimnoi, W., Inpankaew, T., 2021. Evaluation of hematological alteration of vector-borne pathogens in cats from Bangkok, Thailand. *BMC Vet. Res.* 17, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02737-1>
- Duarte, S.C., ; Parente, J.A., ; Pereira, M., ; Soares, C.M., ; Linhares, G.F.C., 2011. Phylogenetic characterization of Babesia canis vogeli in dogs in the state of Goiás, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 20, 274–280.
- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strašek, K., Avši -Županc, T., 2004. Canine babesiosis

- in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res* 35, 363–368. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004018>
- Dumitrache, M.O., Gherman, C.M., Cozma, V., 2012. Hard ticks (Ixodidae) in Romania : surveillance , host associations , and possible risks for tick-borne diseases. *Parasitol Res* 110, 2067–2070. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2703-y>
- Ebani, V.V., Guardone, L., Marra, F., Altomonte, I., Nardoni, S., Mancianti, F., 2020. Arthropod-Borne Pathogens in Stray Cats from Northern Italy: A Serological and Molecular Survey. *Animals* 10, 1–16.
- Eiras, D.F., Basabe, J., Mesplet, M., Schnittger, L., 2008. First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* 157, 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.037>
- Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Baneth, G., Moré, G., 2014. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitol. Int.* 63, 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.06.003>
- Falkenö, U., Tasker, S., Osterman-Lind, E., Tvedten, H.W., 2013. *Theileria annae* in a young Swedish dog. *Acta Vet. Scand.* 55, 50. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-50>
- Far, D., Takács, N., Gyurkovszky, M., Solymosi, N., Farkas, R., 2021. Ticks and Tick-Borne Infections of Dogs in Two Jordanian Shelters. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* XX, 1–6. <https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0026>
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 974–987. <https://doi.org/1590/S0100-736X2010001100012>
- Filoni, C., Catão-Dias, J.L., Cattori, V., Willi, B., Meli, M.L., Corrêa, S.H.R., Marques, M.C., Adania, C.H., Silva, J.C.R., Marvulo, M.F.V., Neto, J.S.F., Durigon, E.L., de Carvalho, V.M., Coutinho, S.D.A., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2012. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. *J. Vet. Diagnostic*

Investig. 24, 166–173. <https://doi.org/10.1177/1040638711407684>

- Földvári, G., Hell, É., Farkas, R., 2005. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. *Vet. Parasitol.* 127, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.016>
- Fournier, G.F. da S.R., Pinter, A., Muñoz-Leal, S., Labruna, M.B., Lopes, M.G., Martins, T.F., Colácio, L., Môra, C.R.S., Moraes-Filho, J., Dias, R.A., 2020. Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29, 1–17. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020003>
- França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., dos Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalli* in dogs in southern Brazil. *Comp. Clin. Path.* 19, 383–387. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1041-2>
- Fredo, G., Bianchi, M. V., De Andrade, C.P., De Souza, S.O., Leite-Filho, R. V., Bandinelli, M.B., Amorim, D.B., Driemeier, D., Sonne, L., 2015. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 51, 880–884. <https://doi.org/10.7589/2014-12-283>
- Fritz, D., 2010. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol. Res.* 106, 1339–1342. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1804-3>
- Frontera-Acevedo, K., Balsone, N.M., Dugan, M.A., Makemson, C.R., Sellers, L.B., Brown, H.M., Peterson, D.S., Creevy, K.E., Garner, B.C., Sakamoto, K., 2013. Systemic immune responses in *Cytauxzoon felis*-infected domestic cats. *Am. J. Vet. Res.* 74, 901–909. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.6.901>
- Frontera-Acevedo, K., Sakamoto, K., 2015. Local pulmonary immune responses in domestic cats naturally infected with *Cytauxzoon felis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.10.012>
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., Xuan, X., 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.* 35, 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.018>

- Furtado, M.M., Taniwaki, S.A., Metzger, B., dos Santos Paduan, K., O'Dwyer, H.L., de Almeida Jácomo, A.T., Porfírio, G.E.O., Silveira, L., Sollmann, R., Tôrres, N.M., Ferreira Neto, J.S., 2017. Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 470–476.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.005>
- Gabrielli, S., Otašević, S., Ignjatović, A., Savić, S., Fraulo, M., Arsić-Arsenijević, V., Momčilović, S., Cancrini, G., 2015. Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 535–538.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1797>
- Gallusová, M., Jirsová, D., Mihalca, A.D., Gherman, C.M., D'Amico, G., Qablan, M.A., Modrý, D., 2016. *Cytauxzoon* Infections in Wild Felids from Carpathian-Danubian-Pontic Space: Further Evidence for a Different *Cytauxzoon* Species in European Felids. *J. Parasitol.* 102, 377–380. <https://doi.org/10.1645/15-881>
- Galván, C., Miranda, J., Mattar, S., Ballut, J., 2018. *Babesia* spp. In dogs from Córdoba, Colombia. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 24, 829–834.
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.19982>
- Georges, K., Ezeokoli, C.D., Newaj-Fyzul, A., Campbell, M., Mootoo, N., Mutani, A., Sparagano, O.A.E., 2008. The application of PCR and reverse line blot hybridization to detect arthropod-borne hemopathogens of dogs and cats in Trinidad. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 196–199.
<https://doi.org/10.1196/annals.1428.082>
- Gottlieb, J., André, M.R., Soares, J.F., Gonçalves, L.R., Tonial de Oliveira, M., Costa, M.M., Labruna, M.B., Bortolini, C.E., Machado, R.Z., Vieira, M.I.B., 2016. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. E *Ehrlichia* spp. em cães de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 172–178.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612016041>
- Gülanber, A., Gorenflot, A., Schetters, T.P.M., Carcy, B., 2006. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet. Parasitol.* 139, 224–230.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.035>
- Guo, W.P., Xie, G.C., Li, D., Su, M., Jian, R., Du, L.Y., 2020. Molecular detection and genetic characteristics of *Babesia gibsoni* in dogs in Shaanxi Province, China.

- Parasites and Vectors 13, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04232-w>
- Haber, M.D., Tucker, M.D., Marr, H.S., Levy, J.K., Burgess, J., Lappin, M.R., Birkenheuer, A.J., 2007. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. *Vet. Parasitol.* 146, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.029>
- Habibi, G., Imani, A., Afshari, A., Bozorgi, S., 2020. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* and *Theileria annulata* in free-ranging dogs and ticks from shahriar county, tehran province, iran. *Iran. J. Parasitol.* 15, 321–331. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i3.4196>
- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S., Pfister, K., 2009. Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 42–45. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1234-3>
- Hamel, D., Silaghi, C., Lescai, D., Pfister, K., 2012. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol. Res.* 110, 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2659-y>
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R.M., Brockmann, S.O., Müller, W., Dorn, N., 2007. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 163–166. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0580>
- Hartley, A.N., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., 2020. *Cytauxzoon felis* cytochrome b gene mutation associated with atovaquone and azithromycin treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 2432–2437. <https://doi.org/10.1111/jvim.15935>
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-jones, T., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2013. BABESIOSIS IN CATS ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 15, 643–646. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489230>
- Harvey, J.W., Dunbar, M.R., Norton, T.M., Yabsley, M.J., 2007. Laboratory findings in acute *Cytauxzoon felis* infection in cougars (*Puma concolor cougar*) in Florida. *J.*

- Zoo Wildl. Med. 38, 285–291. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2007\)038\[0285:LFIACF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2007)038[0285:LFIACF]2.0.CO;2)
- Holman, P.J., Snowden, K.F., 2009. Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and Feline Cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 39, 1035–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.08.002>
- Imre, M., Farkas, R., Ilie, M.S., Imre, K., Dărbăuș, G., 2013. Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: Occurrence of *Babesia gibsoni* associated with breed. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 500–502. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.06.006>
- Inácio, E.L., Pérez-Macchi, S., Alabi, A., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., Okuda, M., Onishi, T., Nakagome, K., Kosugi, R., Hirakawa, M., 2004. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet. Parasitol.* 121, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.012>
- Irizarry-Rovira, A.R., Stephens, J., Christian, J., Kjemtrup, A., DeNicola, D.B., Widmer, W.R., Conrad, P.A., 2001. *Babesia gibsoni* Infection in a Dog from Indiana. *Vet. Clin. Pathol.* 30, 180–188. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00429.x>
- Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: From molecular taxonomy to control. *Parasites and Vectors* 2, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>
- Jacobson, L.S., Schoeman, T., Lobetti, R.G., 2000. A survey of feline babesiosis in South Africa.
- Jain, K.J., Lakshmanan, B., Syamala, K., Praveena, J.E., Aravindakshan, T., 2017. High prevalence of small *Babesia* species in canines of Kerala, South India. *Vet. World* 10, 1319–1323. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1319-1323>
- Jakob, W., Wesemeier, H.H., 1996. A fatal infection in a bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *J. Comp. Pathol.* 114, 439–444. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80018-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80018-1)
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrin, L., 2018. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., Schnittger, L., 2019. Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. Trends Parasitol.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>

James Harris, D., 2016. Naming no names: Comments on the taxonomy of small piroplasmids in canids. Parasites and Vectors 9, 5–6.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1567-5>

Jefferies, R., Ryan, U.M., Muhlnickel, C.J., 2003. Two Species of Canine Babesia in Australia: Detection and Characterization by PCR Ryan. J. Parasitol. 89, 409–412.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0397:SOAUSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0397:SOAUSO]2.0.CO;2)

Jefferies, R., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2007a. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. Vet. Parasitol. 144, 20–27.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>

Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Broughton, D.K., Robertson, I.D., Irwin, P.J., 2007b. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of Babesia gibsoni in dogs. Aust. Vet. J. 85, 459–463. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00220.x>

Jinnai, M., Kawabuchi-Kurata, T., Tsuji, M., Nakajima, R., Hirata, H., Fujisawa, K., Shiraki, H., Asakawa, M., Nasuno, T., Ishihara, C., 2010. Molecular evidence of the multiple genotype infection of a wild Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) by Babesia sp. UR1. Vet. Parasitol. 173, 128–133.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.018>

Jojima, F.S., Garcia, J.L., Vidotto, M.C., Balarin, M.R.S., Fabretti, A.K., Gasparini, M.R., Coelho, M., A.L., Vidotto, O., 2008. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de Babesia em cães de uma população hospitalar da Região de Londrina, PR. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17 Suppl 1, 277–283.

Jongejan, F., Su, B.L., Yang, H.J., Berger, L., Bevers, J., Liu, P.C., Fang, J.C., Cheng, Y.W., Kraakman, C., Plaxton, N., 2018. Molecular evidence for the transovarial passage of Babesia gibsoni in Haemaphysalis hystrix (Acari: Ixodidae) ticks from Taiwan:

A novel vector for canine babesiosis. *Parasites and Vectors* 11, 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2722-y>

Kamani, J., Sannusi, A., Dogo, A.G., Tanko, J.T., Egwu, K.O., Tafarki, A.E., Ogo, I.N., Kemza, S., Onovoh, E., Shamaki, D., Lombin, L.H., Catto, V., Birkenheuer, A.J., 2010. *Babesia canis* and *Babesia rossi* co-infection in an untraveled Nigerian dog. *Vet. Parasitol.* 173, 334–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.040>

Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K.Y., Waziri, N.E., Eyal, O., Guthmann, Y., Harrus, S., 2013. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>

Kamani, J., Chung, P.J., Lee, C.C., Chung, Y.T., 2018. In search of the vector(s) of *Babesia rossi* in Nigeria: molecular detection of *B. rossi* DNA in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) ticks collected from dogs, circumstantial evidence worth exploring. *Exp. Appl. Acarol.* 76, 243–248. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0311-6>

Kelly, P.J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., Stevens, A., Jaegersen, K., Ackerson, K., Gessner, A., Kaltenboeck, B., Wang, C., 2013. Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053450>

Kelly, P. J., Marabini, L., Dutlow, K., Zhang, J., Loftis, A., Wang, C., 2014. Molecular detection of tick-borne pathogens in captive wild felids, Zimbabwe. *Parasites and Vectors* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0514-6>

Kelly, P.J., Köster, L., Li, J., Zhang, J., Huang, K., Branford, G.C., Marchi, S., Vandenplas, M., Wang, C., 2017. Survey of vector-borne agents in feral cats and first report of *Babesia gibsoni* in cats on St Kitts, West Indies. *BMC Vet. Res.* 13, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1230-1>

Ketz-Riley, C.J., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., Hoover, J.P., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2003. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.* 39, 424–430. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.424>

- Kidd, L., 2019. Optimal Vector-borne Disease Screening in Dogs Using Both Serology-based and Polymerase Chain Reaction–based Diagnostic Panels. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 49, 703–718.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.011>
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2006. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Vet. Parasitol.* 138, 112–117.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.045>
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 138, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.044>
- Kocan, A.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Mukolwe, S.W., 1992. A Redescription of Schizogony of *Cytauxzoon felis* in the Domestic Cat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 653, 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb19639.x>
- Kocan, K.M., 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from Bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to Domestic Cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildl. Dis.* 20, 241–242.
- Köster, L.S., Lobetti, R.G., Kelly, P., 2015. Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Vet. Med. Res. Reports* 6, 119–128.
- Krawczak, F. da S., Reis, I.A., da Silveira, J.A., Avelar, D.M., Marcelino, A.P., Werneck, G.L., Labruna, M.B., Paz, G.F., 2015. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 64–68. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0291-2014>
- Labruna, M.B., De Paula, C.D., Lima, T.F., Sana, D.A., 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1133–1136. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800012>
- Lack, J.B., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., 2012. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 42, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>
- Leclaire, S., Menard, S., Berry, A., 2015. Molecular characterization of *Babesia* and

- Cytauxzoon species in wild South-African meerkats. *Parasitology* 142, 543–548.
<https://doi.org/10.1017/S0031182014001504>
- Legroux, J.P., Halos, L., René-Martellet, M., Servonnet, M., Pingret, J.L., Bourdoiseau, G., Baneth, G., Chabanne, L., 2017. First clinical case report of Cytauxzoon sp. infection in a domestic cat in France. *BMC Vet. Res.* 13, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1009-4>
- Lehtinen, L.E., Birkenheuer, A.J., Droleskey, R.E., Holman, P.J., 2008. In vitro cultivation of a newly recognized Babesia sp. in dogs in North Carolina. *Vet. Parasitol.* 151, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.022>
- Leisewitz, A.L., Goddard, A., Clift, S., Thompson, P.N., de Gier, J., Van Engelshoven, J.M.A.J.A.J., Schoeman, J.P., 2019. A clinical and pathological description of 320 cases of naturally acquired Babesia rossi infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 271, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.005>
- Lemos, T.D., Cerqueira, A. de M.F., Toma, H.K., da Silva, A.V., Corrêa, R.G.B., Paludo, G.R., Massard, C.L., Almosny, N.R.P., 2012. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 137–142. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000200012>
- Lemos, T.D., Toma, H.K., Assad, R.Q., Da Silva, A.V., Corrêa, R.G.B., Almosny, N.R.P., 2017. Clinical and hematological evaluation of Rangelia vitalii-naturally infected dogs in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 307–313.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612017040>
- Lewis, Kristin M., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., 2012a. Lack of evidence for perinatal transmission of Cytauxzoon felis in domestic cats. *Vet. Parasitol.* 188, 172–174.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.019>
- Lewis, Kristin M, Cohn, L.A., Downey, M.E., Whitney, M.S., Birkenheuer, A.J., 2012b. Evaluation of Cytauxzoon felis infection status in captive-born wild felids housed in an area endemic for the pathogen. *JAVMA* 241, 1088–1092.
- Li, X.W., Zhang, X.L., Huang, H.L., Li, W.J., Wang, S.J., Huang, S.J., Shao, J.W., 2020. Prevalence and molecular characterization of Babesia in pet dogs in Shenzhen,

- China. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 101452.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101452>
- Lingard, A., Jennings, E., 1904. A Preliminary Note on a Pyroplasmosis Found in Man, and in Some of the Lower Animals. *Ind. Med. Gaz.* 39, 161–165.
- Lira-Amaya, J.J., Rojas-Martínez, C., Álvarez-Martínez, A., Pelaez-Flores, A., Martínez-Ibañez, F., de la Rosa, D., Figueroa-Millan, J. V., 2017. First Molecular Detection of *Babesia canis vogeli* in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* from Mexico. *Arch. Palliat. Care* 2, 1013.
- Little, S.E., Barrett, A.W., Nagamori, Y., Herrin, B.H., Normile, D., Heaney, K., Armstrong, R., 2018. Ticks from cats in the United States: Patterns of infestation and infection with pathogens. *Vet. Parasitol.* 257, 15–20.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.002>
- Liu, I.L., Chi, N.Y., Chang, C.L., Hung, M.L., Chiu, C.T., Chen, H.W., 2019. A novel PCR-based point-of-care method enables rapid, sensitive and reliable diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *BMC Vet. Res.* 15, 1–5.
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2181-5>
- Lloret, A., Addie, D.D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K., 2015. Cytauxzoonosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 17, 642–644.
<https://doi.org/10.1177/1098612X15589879>
- Lopes, S.T.A., Loretto, A.P., Mazzanti, C.M., França, R.T., Da Silva, A.S., 2014. Canine rangeliiosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day – A review. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 1–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.005>
- Loretto, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.011>
- Luaces, I.S., Aguirre, E., García-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sán-Chez, C., Galka, M., Fernández, P., Ngel Sainz, A., 2005. First Report of an

- Intraerythrocytic Small Piroplasm in Wild Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *J. Wildl. Dis.* 41, 810–815. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.810>
- M'ghirbi, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.018>
- Maggi, R.G., Birkenheuer, A.J., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2013. Advantages and Limitations of Serological and Molecular Panels for the Diagnosis of Vector-Borne Infectious Diseases in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 720.
- Maggi, R.G., Krämer, F., 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites and Vectors.* <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, Â., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L., Campino, L., 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites and Vectors* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-115>
- Maia, L.M.P., Cerqueira, A. de M.F., de Barros Macieira, D., de Souza, A.M., Moreira, N.S., da Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R.P., 2013. Cytauxzoon felis and “Candidatus Mycoplasma haemominutum” coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 289–291. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000200049>
- Malheiros, J., Costa, M.M., do Amaral, R.B., de Sousa, K.C.M., André, M.R., Machado, R.Z., Vieira, M.I.B., 2016. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>
- Manoj, R.R.S., Iatta, R., Latrofa, M.S., Capozzi, L., Raman, M., Colella, V., Otranto, D., 2020. Canine vector-borne pathogens from dogs and ticks from Tamil Nadu, India. *Acta Trop.* 203, 105308. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105308>
- Mans, B.J., Pienaar, R., Latif, A.A., 2015. A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 104–118.

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>

- Mascarelli, P.E., Tartara, G.P., Pereyra, N.B., Maggi, R.G., 2016. Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites and Vectors* 9, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1920-8>
- Masuda, M., Otsuka-Yamasaki, Y., Shiranaga, N., Iguchi, A., Uchida, N., Sato, R., Yamasaki, M., 2019. Retrospective study on intercurrent pancreatitis with *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 1558–1563. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0280>
- Matjila, P.T., Penzhorn, B.L., Bekker, C.P.J., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2004. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 122, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.019>
- Matjila, P. T., Leisewitz, A.L., Oosthuizen, M.C., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008a. Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 157, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.025>
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008b. Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 155, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.012>
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1993. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it.” *Eur. J. Protistol.* 29, 279–293. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80371-8](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80371-8)
- Meier, H.T., Moore, L.E., 2000. Feline Cytauxzoonosis: A Case Report and Literature Review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 36, 493–496. <https://doi.org/10.5326/15473317-36-6-493>
- Meinkoth, J., Kocan, A.A., Whitworth, L., Murphy, G., Fox, J.C., Woods, J.P., 2000. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998). *J. Vet. Intern. Med.* 14, 521–525. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02270.x>
- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., Loud, S.D., Lorenz, M.D., 2002. Clinical and hematologic effects of experimental infection of dogs with recently identified *Babesia gibsoni*-like isolates from Oklahoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 185–189.

<https://doi.org/10.2460/javma.2002.220.185>

- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., 2005. Feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 35, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.003>
- Melco, A.L., Petrovitch, N.P., Birkenheuer, A.J., Yang, T.S., Schreeg, M.E., Savage, M., 2021. Pathognomonic thoracic radiographic findings are lacking in cats with acute Cytauxzoonosis. *Vet. Radiol. Ultrasound* 62, 141–149. <https://doi.org/10.1111/vru.12935>
- Melo, A.L.T., Witter, R., Martins, T.F., Pacheco, T.A., Alves, A.S., Chitarra, C.S., Dutra, V., Nakazato, L., Pacheco, R.C., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., 2016. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 30, 112–116. <https://doi.org/10.1111/mve.12139>
- Meredith, A.M., Bienzle, D., Beeler-Marfisi, J., 2019. What is your diagnosis? A feline blood smear. *Vet. Clin. Pathol.* 48, 128–130. <https://doi.org/10.1111/vcp.12682>
- Mihalca, A., Cozma, V., Şuteu, E., Marinculic, A., Boireau, P., 2010. The quest for piroplasms: from Babeş and Smith to molecules. *Sci. Parasitol* 11, 14–19.
- Milla, J., Naranjo, V., Rodríguez, A., Rodríguez, R., Pé, J.M., De, R., Lastra, L.A., Mangold, A.J., De, J., Fuente, L.A., Luisa, M., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of Cytauxzoon species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134, 995–1001. <https://doi.org/10.1017/S003118200700248X>
- Miró, G., Checa, R., Paparini, A., Ortega, N., González-Fraga, J.L., Gofton, A., Bartolomé, A., Montoya, A., Gálvez, R., Mayo, P.P., Irwin, P., 2015. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: Clinical report of 75 cases. *Parasites and Vectors* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0825-2>
- Mittal, M., Kundu, K., Chakravarti, S., Mohapatra, J.K., Singh, V.K., Raja Kumar, B., Thakur, V., Churamani, C.P., Kumar, A., 2019. Canine babesiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive haematological, biochemical, clinicopathological and molecular epidemiological multiregional study. *Prev. Vet. Med.* 169, 104696. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104696>
- Moghaddam, M.R., Zaeemi, M., Gholam, &, Razmi, R., 2020. Preliminary study of

- Cytauxzoon felis infection in outdoor cats in Mashhad, Iran. *Parasitol. Res.* 3, 4177–4183. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06780-7>/Published
- Mongruel, A.C.B., Stedile, S.T. de O., Sousa, M.G., Valente, J.D., Barbosa, I.C., Spanhol, V.C., Sezyshta, A., Weber, L.F.S., Vieira, T.S.W.J., Vieira, R.F. da C., 2017. Molecular Detection of *Rangelia Vitalii* in a Dog From the Curitiba Metropolitan Region, Parana State, Southern Brazil. *Arch. Vet. Sci.* 22, 139–144. <https://doi.org/10.5380/avs.v22i4.56936>
- Moraes, P.H.G., Rufino, C.P., Reis, T., Aguiar, D.C.F., Meneses, A.M.C., Gonçalves, E.C., 2014. Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 105–108. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014017>
- Moraes, P.H.G., Rufino, C.P., Baraúna, A.R.F., Reis, T., Agnol, L.T.D., 2015. Molecular characterization in dogs from Belém , northern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14, 16364–16371.
- Moreira, M.V.L.; Guimarães, L.B., Silva, J.F.; Ocarino, N. de Melo.; Sekarides, R.; Ecco, R., 2013. INFECÇÃO POR *Rangelia vitalii* EM UM CÃO EM MINAS GERAIS (*Rangelia vitalii* infection in a dog in Minas Gerais). *Arch. Vet. Sci.* 18, 637–640.
- Morters, M.K., Archer, J., Ma, D., Matthee, O., Goddard, A., Leisewitz, A.L., Matjila, P.T., Wood, J.L.N., Schoeman, J.P., 2020. Long-term follow-up of owned, free-roaming dogs in South Africa naturally exposed to *Babesia rossi*. *Int. J. Parasitol.* 50, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.11.006>
- Nalubamba, K.S., Mudenda, N.B., Namwila, M.M., Mulenga, C.S., Bwalya, E.C., M’Kandawire, E., Saasa, N., Hankanga, C., Oparaocha, E., Simuunza, M., 2015. A Study of Naturally Acquired Canine Babesiosis Caused by Single and Mixed *Babesia* Species in Zambia: Clinicopathological Findings and Case Management. *J. Parasitol. Res.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/985015>
- Nayyar Ghauri, H., Ijaz, M., Farooqi, S.H., Ali, A., Ghaffar, A., Saleem, S., Iqbal, M.K., Aziz, M.U., Ghani, U., Ullah, M.R., Ahmad, H.M., 2019. A comprehensive review on past, present and future aspects of canine theileriosis. *Microb. Pathog.* 126, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.033>

- Nentwig, A., Meli, M.L., Schrack, J., Reichler, I.M., Riond, B., Gloor, C., Howard, J., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., 2018. First report of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats in Switzerland: natural and transfusion-transmitted infections. *Parasit. Vectors* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2728-5>
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 38, 607–610. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.3.607>
- O'Dwyer, L.H., Lopes, V. von A., Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Ribolla, P.E.M., 2009. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 23–26. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01802005>
- Øines, Ø., Storli, K., Brun-Hansen, H., 2010. First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Vet. Parasitol.* 171, 350–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.024>
- Oliveira, L.P., Cardozo, G.P., Santos, E.V., Mansur, M.A.B., Donini, I.A.N., Zissou, V.G., Roberto, P.G., Marins, M., 2009. Molecular analysis of the rRNA genes of *Babesia* spp and *Ehrlichia canis* detected in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 40, 238–240. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000200006>
- Oliveira, T.M.F. d. S., Furuta, P.I., de Carvalho, D., Machado, R.Z., 2008. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 7–11.
- Oyamada, M., Davoust, B., Dereure, J., Bucheton, B., 2005. Detection of *Babesia* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1343–1346. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1343>
- Paim, C.B., Lopes, S.T.A., França, R.T., Soares, J.F., Da Silva, A.S., Dornelles, G.L., Monteiro, S.G., Labruna, M.B., Costa, M.M., Mazzanti, C.M., Paim, F.C., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp. Parasitol.* 128, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.010>
- Paim, F.C., dos Santos, A.P., do Nascimento, N.C., Lasta, C.S., Oliveira, S.T., Messick,

- J.B., Lopes, S.T. dos A., 2016. Development of a quantitative PCR for the detection of *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 217, 113–117.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.018>
- Panait, L.C., Stock, G., Globokar, M., Balzer, J., Groth, B., Mihalca, A.D., Pantchev, N., 2020. First report of *Cytauxzoon* sp. infection in Germany: organism description and molecular confirmation in a domestic cat. *Parasitol. Res.* 119, 3005–3011.
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06811-3>
- Panait, L.C., Mihalca, A.D., Modrý, D., Juránková, J., Ionică, A.M., Deak, G., Gherman, C.M., Heddergott, M., Hodžić, A., Veronesi, F., Reichard, M., Zieman, E.A., Nielsen, C.K., Jiménez-Ruiz, F.A., Hrazdilová, K., 2021. Three new species of *Cytauxzoon* in European wild felids. *Vet. Parasitol.* 290.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109344>
- Pantchev, N., Pluta, S., Huisinga, E., Nather, S., Scheufelen, M., Vrhovec, M.G., Schweinitz, A., Hampel, H., Straubinger, R.K., 2015. Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis, *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4513-0>
- Panti-may, J.A., Rodríguez-vivas, R.I., 2020. Canine babesiosis : A literature review of prevalence , distribution , and diagnosis in Latin America and the Caribbean. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 21, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>
- Passos, L.M.F., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Zahler-Rinder, M., 2005. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.028>
- Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Karvelienø, B., Grigonis, A., Aleksandravičienø, A., Zamokas, G., Babickaitø, L., Sabunas, V., Petkevičius, S., 2014. Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania. *Vet. Parasitol.* 205, 702–706.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.001>
- Paulino, P.G., Pires, M.S., da Silva, C.B., Peckle, M., da Costa, R.L., Vitari, G.L.V., de Abreu, A.P.M., Massard, C.L., Santos, H.A., 2018. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet.*

- Parasitol. Reg. Stud. Reports 13, 160–165.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.06.004>
- Pedrassani, D., Biolchi, J., Gonçalves, L.R., Mendes, N.S., Zanatto, D.C. de S., Calchi, A.C., Machado, R.Z., André, M.R., 2019. Molecular detection of vector-borne agents in cats in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28, 632–643.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612019077>
- Peixoto, P. V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.* 145, 383–387.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.023>
- Penzhorn, B.L., Lewis, B.D., López-Rebollar, L.M., Swan, G.E., 2000. Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71, 53–57. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i1.678>
- Penzhorn, B.L., Kjemtrup, A.M., L.M.L.-R, 2001. *Babesia leo* n. sp. from Lions in the Kruger National Park, South Africa, and Its Relation to Other Small Piroplasmids. *J. Parasitol.* 87, 681–685.
- Penzhorn, B.L., Schoeman, T., Jacobson, L.S., 2004. Feline babesiosis in South Africa: A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 183–186.
<https://doi.org/10.1196/annals.1307.027>
- Penzhorn, B.L., 2011. Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. *Parasites and Vectors* 4, 2–7.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-51>
- Penzhorn, B.L., Vorster, I., Harrison-White, R.F., Oosthuizen, M.C., 2017. Black-backed jackals (*Canis mesomelas*) are natural hosts of *Babesia rossi*, the virulent causative agent of canine babesiosis in sub-Saharan Africa. *Parasites and Vectors* 10, 1–6.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2057-0>
- Penzhorn, B.L., Harrison-White, R.F., Stoltz, W.H., 2020. Completing the cycle: *Haemaphysalis elliptica*, the vector of *Babesia rossi*, is the most prevalent tick infesting black-backed jackals (*Canis mesomelas*), an indigenous reservoir host of *B. rossi* in South Africa. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101325.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101325>

- Penzhorn, B.L., Oosthuizen, M.C., 2020. Babesia Species of Domestic Cats: Molecular Characterization Has Opened Pandora's Box. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00134>
- Persichetti, M.F., Solano-Gallego, L., Serrano, L., Altet, L., Reale, S., Masucci, M., Pennisi, M.G., 2016. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasites and Vectors* 9, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1534-1>
- Pollard, D.A., Reichard, M. V., Cohn, L.A., James, A.M., Holman, P.J., 2017. Genetic variability of cloned *Cytauxzoon felis* ribosomal RNA ITS1 and ITS2 genomic regions from domestic cats with varied clinical outcomes from five states. *Vet. Parasitol.* 244, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.002>
- Prakash, B.K., Low, V.L., Vinnie-Siow, W.Y., Tan, T.K., Lim, Y.A.L., Morvarid, A.R., Abubakar, S., Sofian-Azirun, M., 2018. Detection of Babesia spp. In Dogs and Their Ticks from Peninsular Malaysia: Emphasis on Babesia gibsoni and Babesia vogeli Infections in Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 55, 1337–1340. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy072>
- Proboste, T., Kalema-Zikusoka, G., Altet, L., Solano-Gallego, L., Fernández De Mera, I.G., Chirife, A.D., Muro, J., Bach, E., Piazza, A., Cevitanes, A., Blanda, V., Mugisha, L., De La Fuente, J., Caracappa, S., Millán, J., 2015. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. *Parasites and Vectors* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0919-x>
- Qablan, M.A., Kubelová, M., Šíroký, P., Modrý, D., Amr, Z.S., 2012. Stray dogs of northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitol. Res.* 111, 301–307. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2839-4>
- Qurollo, B.A., Archer, N.R., Schreeg, M.E., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Haney, K.N., Thomas, B.S., Breitschwerdt, E.B., 2017. Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors* 10, 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2064-1>
- Qurollo, B., 2019. Feline Vector-Borne Diseases in North America. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 49, 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.012>

- Raghavan, R.K., Almes, K., Goodin, D.G., Harrington, J.A., Stackhouse, P.W., 2014. Spatially heterogeneous land cover/land use and climatic risk factors of tick-borne feline cytauxzoonosis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 486–495.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1496>
- Ramos, R., Ramos, C., Araújo, F., Oliveira, R., Souza, I., Pimentel, D., Galindo, M., Santana, M., Rosas, E., Faustino, M., Alves, L., 2010. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol. Res.* 107, 1115–1120. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7>
- Rani, A., Irwin, P.A., Coleman, P.J., Gatne, M., Traub, R.J., 2011. A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasites and Vectors* 4, 141.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-141>
- Reichard, M. V., Baum, K.A., Cadenhead, S.C., Snider, T.A., 2008. Temporal occurrence and environmental risk factors associated with cytauxzoonosis in domestic cats. *Vet. Parasitol.* 152, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.031>
- Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91, 420–426.
<https://doi.org/10.1645/GE-384R>
- Reichard, M. V., Meinkoth, J.H., Edwards, A.C., Snider, T.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Little, S.E., 2009. Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol.* 161, 110–115.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.016>
- Reichard, M. V., Edwards, A.C., Meinkoth, J.H., Snider, T.A., Meinkoth, K.R., Heinz, R.E., Little, S.E., 2010. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. *J. Med. Entomol.* 47, 890–896. <https://doi.org/10.1603/ME10013>
- Rembeck, K., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Rabelo, E.M.L., Costa-Júnior, L.M., Passos, L.M.F., Zahler-Rinder, M., 2012. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 188, 160–163.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.015>

- René-Martellet, M., Moro, C.V., Chêne, J., Bourdoiseau, G., Chabanne, L., Mavingui, P., 2015. Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Vet. Res.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0525-3>
- Ribeiro, C.M., Matos, A.C., Azzolini, T., Bones, E.R., Wasnieski, E.A., Richini-Pereira, V.B., Lucheis, S.B., Vidotto, O., 2017. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 37, 129–136. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000200006>
- Rivero, R., et al, 2017. Description of an outbreak of canine rangeliiosis in the northwest littoral of Uruguay. *Vet.* 54, 15–22.
- Rizzi, T.E., Reichard, M. V., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., Taylor, J.D., Meinkoth, J.H., 2015. Prevalence of *Cytauxzoon felis* infection in healthy cats from enzootic areas in Arkansas, Missouri, and Oklahoma. *Parasites and Vectors* 8, 14–19. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0618-z>
- Rjeibi, M.R., Amairia, S., Rouatbi, M., Ben Salem, F., Mabrouk, M., Gharbi, M., 2016. Molecular prevalence and genetic characterization of piroplasms in dogs from Tunisia. *Parasitology* 143, 1622–1628. <https://doi.org/10.1017/S003118201600113X>
- Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., Baneth, G., 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* 199, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>
- Rosa, C.T., Pazzi, P., Nagel, S., McClure, V., Christie, J., Troskie, M., Dvir, E., 2014. Theileriosis in six dogs in South Africa and its potential clinical significance. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 85, 1–7. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1114>
- Rotondano, T.E. de F., Almeida, H.K.A., Krawczak, F. da S., Santana, V.L., Vidal, I.F., Labruna, M.B., de Azevedo, S.S., de Almeida, A.M.P., de Melo, M.A., 2015. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal* 24, 52–58.
- Sacristán, I., Sieg, M., Acuña, F., Aguilar, E., García, S., López, M.J., Cevidanes, A.,

- Hidalgo-Hermoso, E., Cabello, J., Vahlenkamp, T.W., Millán, J., Poulin, E., Napolitano, C., 2019. Molecular and serological survey of carnivore pathogens in free-roaming domestic cats of rural communities in southern Chile. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 1740–1748. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0208>
- Salim, B., Alanazi, A.D., Omori, R., Alyousif, M.S., Alanazi, I.O., Katakura, K., Nakao, R., 2019. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. *Acta Trop.* 193, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.029>
- Salim, M.A., Akhtar, R., Lateef, M., Rashid, M.I., Akbar, H., Shehzad, W., Akhtar, F., Islam, S., Farooqi, S.H., Durrani, U.F., 2018. First report on optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of *Babesia felis*. *Indian J. Anim. Res.* 52, 401–404. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-567>
- Sánchez, R.O.; Moré, G; Eiras, D., 2017. Morfología de estructuras parasitarias de *Rangelia vitalii* Muestras De Perros Naturalmente Infectados. *Analecta Vet* 37, 60–65.
- Santos, F., Coppede, J.S., Pereira, A.L.A., Oliveira, L.P., Roberto, P.G., Benedetti, R.B.R., Zucoloto, L.B., Lucas, F., Sobreira, L., Marins, M., 2009. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet. J.* 179, 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.017>
- Santos, F.M., de Sousa, K.C.M., Sano, N.Y., Nantes, W.A.G., Liberal, S.C., Machado, R.Z., André, M.R., Herrera, H.M., 2021. Relationships between vector-borne parasites and free-living mammals at the Brazilian Pantanal. *Parasitol. Res.* 120, 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07028-0>
- Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H.O., Hirata, H., Ikadai, H., Oyamada, T., 2007. Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 1191–1193. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.1191>
- Schettlers, T., 2019. Mechanisms involved in the persistence of *Babesia canis* infection in dogs. *Pathogens* 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030094>
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. *Babesia*: A

- world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1788–1809.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Schnittger, M.F.-C.L., 2018. Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets, Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_3
- Schoeman, T., Lobetti, R.G., Jacobson, L.S., Penzhorn, B.L., 2001. Feline babesiosis: Signalment, clinical pathology and concurrent infections. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 72, 4–11. <https://doi.org/10.4102/jsava.v72i1.601>
- Schoeman, 2009. Canine Babesiosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 76, 59–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.08.001>
- Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J., Cohn, L.A., Levy, M.G., Birkenheuer, A.J., 2013. Pharmacogenomics of *Cytauxzoon felis* cytochrome b: Implications for atovaquone and azithromycin therapy in domestic cats with cytauxzoonosis. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3066–3069. <https://doi.org/10.1128/JCM.01407-13>
- Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J.L., Cohn, L.A., Levy, M.G., Birkenheuer, A.J., 2015. Rapid high-resolution melt analysis of *cytauxzoon felis* cytochrome b to aid in the prognosis of cytauxzoonosis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2517–2524.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00635-15>
- Schreeg, M.E., Marr, H.S., Griffith, E.H., Tarigo, J.L., Bird, D.M., Reichard, M. V., Cohn, L.A., Levy, M.G., Birkenheuer, A.J., 2016a. PCR amplification of a multi-copy mitochondrial gene (*cox3*) improves detection of *Cytauxzoon felis* infection as compared to a ribosomal gene (*18S*). *Vet. Parasitol.* 225, 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.013>
- Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J.L., Cohn, L.A., Bird, D.M., Scholl, E.H., Levy, M.G., Wiegmann, B.M., Birkenheuer, A.J., 2016b. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of *Piroplasmida* phylogeny. *PLoS One* 11, 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>
- Sherrill, M.K., Cohn, L.A., 2015. Cytauxzoonosis: Diagnosis and treatment of an emerging disease. *J. Feline Med. Surg.* 17, 940–948.
<https://doi.org/10.1177/1098612X15610681>

- Shock, B.C., Murphy, S.M., Patton, L.L., Shock, P.M., Olfenbuttel, C., Beringer, J., Prange, S., Grove, D.M., Peek, M., Butfiloski, J.W., Hughes, D.W., Lockhart, J.M., Bevins, S.N., VandeWoude, S., Crooks, K.R., Nettles, V.F., Brown, H.M., Peterson, D.S., Yabsley, M.J., 2011. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. *Vet. Parasitol.* 175, 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.009>
- Shock, B.C., Birkenheuer, A.J., Patton, L.L., Olfenbuttel, C., Beringer, J., Grove, D.M., Peek, M., Butfiloski, J.W., Hughes, D.W., Lockhart, J.M., Cunningham, M.W., Brown, H.M., Peterson, D.S., Yabsley, M.J., 2012. Variation in the ITS-1 and ITS-2 rRNA genomic regions of *Cytauxzoon felis* from bobcats and pumas in the eastern United States and comparison with sequences from domestic cats. *Vet. Parasitol.* 190, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.010>
- Shock, B.C., Moncayo, A., Cohen, S., Mitchell, E.A., Williamson, P.C., Lopez, G., Garrison, L.E., Yabsley, M.J., 2014. Diversity of piroplasms detected in blood-fed and questing ticks from several states in the United States. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.003>
- Sikorski, L.E., Birkenheuer, A.J., Holowaychuk, M.K., McCleary-Wheeler, A.L., Davis, J.M., 2010. Babesiosis Caused by a Large *Babesia* Species in 7 Immunocompromised Dogs. *J Vet Intern Med* 24, 127–131.
- Sili, G., Byaruhanga, C., Horak, I., Steyn, H., Chaisi, M., Oosthuizen, M.C., Neves, L., 2021. Ticks and tick-borne pathogens infecting livestock and dogs in Tchicala-Tcholoanga, Huambo Province, Angola. *Parasitol. Res.* 120, 1097–1102. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07009-3>
- Silva, A.B., Costa, A.P., De Sá, J.C., Costa, F.B., Dos Santos, A.C.G., De Candanedo Guerra, R.D.M.S.N., 2012. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. *Cienc. Anim. Bras.* 13, 388–395. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i3.18439>
- Silva; B.R; Kuteques, F.M., Koch, G.; de Oliveira, M.; Beltrame, O.C., Taques, I., Granjeiro, I.G.; A. N.; Aguiar, D.M.; Locatelli, R. 2019. Detection molecular of *Rangelia vitalii* in dogs from Parana State, Southern Brazil. *Brazilian J. Vet.*

Parasitol. 2961, 310–313.

Silveira, J.A.G., D'Elia, M.L., de Oliveira Avelar, I., de Almeida, L.R., dos Santos, H.A., de Magalhães Soares, D.F., Ribeiro, M.F.B., dos Santos Lima, W., Ecco, R., 2016.

Rangelia vitalii in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5, 280–285.

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.003>

Simes, P.B., Cardoso, L., Arajo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2011. Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - First report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites and Vectors* 4, 50.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-50>

Simking, P., Wongnakphet, S., Stich, R.W., Jittapalpong, S., 2010. Detection of *Babesia vogeli* in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand. *Vet. Parasitol.* 173, 70–75.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.025>

Singh, A., Singh, H., Singh, N.K., Singh, N.D., Rath, S.S., 2014. Canine babesiosis in Northwestern India: Molecular detection and assessment of risk factors. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/741785>

Singh, M.N., Raina, O.K., Sankar, M., Rialch, A., Tigga, M.N., Kumar, G.R., Banerjee, P.S., 2016. Molecular detection and genetic diversity of *Babesia gibsoni* in dogs in India. *Infect. Genet. Evol.* 41, 100–106.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.025>

Singla, L. Das, Sumbria, D., Mandhotra, A., Bal, M.S., Kaur, P., 2016. Critical analysis of vector-borne infections in dogs: *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in Punjab, India. *Acta Parasitol.* 61, 697–706.

<https://doi.org/10.1515/ap-2016-0098>

Smith, T., Kilborne, F.L., 2017. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever /. *Investig. into nature, causation, Prev. Texas or South. cattle fever /*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.124068>

Snider, T.A., Confer, A.W., Payton, M.E., 2010. Pulmonary histopathology of *Cytauxzoon felis* infections in the cat. *Vet. Pathol.* 47, 698–702.

<https://doi.org/10.1177/0300985810364527>

- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>
- Soares, J.F., 2014. História natural da rangelióse. Tese 123.
<https://doi.org/10.11606/T.10.2014.tde-19092014-092438>
- Soares, J.F., Dall, B., Costa, F.B., Krawczak, F.S., Comerlato, A.T., Rossato, B.C.D., Linck, C.M., Sigahi, E.K.O., Teixeira, R.H.F., Sonne, L., Hagiwara, M.K., Gregori, F., Isabel, M., Vieira, B., Martins, J.R., Reck, J., Labruna, M.B., 2014. Veterinary Parasitology Natural infection of the wild canid , *Cerdocyon thous* , with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 156–163.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.058>
- Soares, J.F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2015. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Vet. Parasitol.* 210, 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.013>
- Soares, J.F., Costa, F.B., Giroto-Soares, A., Da Silva, A.S., França, R.T., Taniwaki, S.A., Dall’Agnol, B., Reck, J., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B., 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliósis. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1221–1234. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.004>
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157, 211–221.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.024>
- Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.* 181, 48–60.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>
- Solano-Gallego, L., Capri, A., Pennisi, M.G., Caldin, M., Furlanello, T., Trotta, M., 2015. Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasites and Vectors* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0824-3>

- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. A review of canine babesiosis: The European perspective. *Parasites and Vectors* 9, 1–18.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>
- Sousa, K.C.M. de, André, M.R., Herrera, H.M., Andrade, G.B. de, Jusi, M.M.G., Santos, L.L. dos, Barreto, W.T.G., Machado, R.Z., Oliveira, G.P. de, 2013. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 525–531. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000400012>
- Souza, V.K. De, Agnol, B.D., Souza, U.A., Webster, A., Peters, F.B., 2019. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida : Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitol. Res.* 118, 1337–1342.
- Spada, E., Proverbio, D., Galluzzo, P., Perego, R., Bagnagatti De Giorgi, G., Roggero, N., Caracappa, S., 2014. Frequency of piroplasms *Babesia microti* and *Cytauxzoon felis* in stray cats from northern Italy. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2014/943754>
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Machado, R.Z., Moraes-Filho, J., Zago, A.M., Donatele, D.M., Pinheiro, S.R., Silveira, I., Caliari, K.M., Yoshinari, N.H., 2010. Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 201–206. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0595>
- Spolidorio, M.G., Torres, M., da Silva Campos, W.N., Melo, A.L.T., Igarashi, M., Amude, A.M., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., 2011. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 253–255. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000300015>
- Starkey, L.A., Newton, K., Bruncker, J., Crowdis, K., Edourad, E.J.P., Meneus, P., Little, S.E., 2016. Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Haiti. *Vet. Parasitol.* 224, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.017>
- Tabar, M.D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2009. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniosis. *Vet. Rec.* 164, 112–116.
<https://doi.org/10.1136/vr.164.4.112>

- Tarigo, J.L., Scholl, E.H., Bird, D.M.K., Brown, C.C., Cohn, L.A., Dean, G.A., Levy, M.G., Doolan, D.L., Trieu, A., Nordone, S.K., Felgner, P.L., Vigil, A., Birkenheuer, A.J., 2013. A Novel Candidate Vaccine for Cytauxzoonosis Inferred from Comparative Apicomplexan Genomics. *PLoS One* 8, 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071233>
- Tarigo, J.L., Kelly, L.S., Brown, H.M., Peterson, D.S., 2019. Limited genetic variability of *Cytauxzoon felis* apical membrane antigen-1 (*ama1*) from domestic cats and bobcats. *Parasites and Vectors* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3347-5>
- Temoche, L.C., Assad, R., Seabra-junior, E.S., Lemos, T.D., Almosny, N., 2018. Frequency of *Babesia vogeli* in domestic dogs in the metropolitan area of Piura , Peru Piroplasmosis is an important tick-borne protozoal disease worldwide , caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* (Vannier and Krause 2012. *ACTA VET.* 87, 255–260.
- Thomas, J.E., Ohmes, C.M., Payton, M.E., Hostetler, J.A., Reichard, M. V, 2018. Minimum transmission time of *Cytauxzoon felis* by *Amblyomma americanum* to domestic cats in relation to duration of infestation , and investigation of ingestion of infected ticks as a potential route of transmission. *J. Feline Med. Surg.* 2018 20, 67–72. <https://doi.org/10.1177/1098612X17691172>
- Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., de Moraes, H.S.A., 2006a. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 140, 223–230.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>
- Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., de Moraes, H.S.A., 2006b. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 141, 177–180.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>
- Traversa, D., Hodžic, A., Hafeez, M.A., Ravindran, R., Kumar, A.K., Malangmei, L., Gopalan Ajith Kumar, K., Nandini, A., Angeline Felicia Bora, C., Varghese, A., Mallappa Amrutha, B., Somalingappa Kurbet, P., Kariyappa Pradeep, R., Nimisha, M., Kalarickal Deepa, C., John, L., 2021. Molecular Characterization of Hemoparasites and Hemoplasmas Infecting Domestic Cats of Southern India.

Front. Vet. Sci 7, 597598. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597598>

- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2009. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet. Parasitol.* 165, 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.022>
- Uilenberg, G., Franssen, F.F., Perié, N.M., Spanjer, A.A., 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11, 33–40. <https://doi.org/10.1080/01652176.1989.9694194>
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia*-A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- Uilenberg, G., Gray, J., Kahl, O., 2018. Research on Piroplasmorida and other tick-borne agents: Are we going the right way? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 860–863. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.005>
- Ullal, T., Birkenheuer, A., Vaden, S., 2018. Azotemia and proteinuria in dogs infected with *Babesia gibsoni*. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 54, 156–160. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6693>
- Vargas-Hernández, G., André, M.R., Faria, J.L.M., Munhoz, T.D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M., 2012. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet. Parasitol.* 186, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
- Varshney, J., Deshmukh, V.V., Chaudhary, P.S., 2009. Fatal Cytauxzoonosis in a Kitten. *Intas Polivet* 10, 392–393.
- Vasconcelos, M.F., 2010. Estudo Da Infecção Por *Babesia* Spp. Em Cães Da Região Periurbana De Brasília, Distrito Federal. Dissertação 85.
- Víchová, B., Miterpáková, M., Iglódyová, A., 2014. Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis canis* in *Dirofilaria*-positive dogs from Slovakia. *Vet. Parasitol.* 203, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.022>
- Vieira, F. de T., Acosta, I.C.L., Martins, T.F., Filho, J.M., Krawczak, F. da S., Barbieri, A.R.M., Egert, L., Fernandes, D.R., Braga, F.R., Labruna, M.B., Dietze, R., 2018.

- Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 249, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.005>
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, V.L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., Silvestre-Ferreira, A.C., 2013. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites and Vectors* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-99>
- Viljoen, S., O’Riain, M.J., Penzhorn, B.L., Drouilly, M., Vorster, I., Bishop, J.M., 2021. Black-backed jackals (*Canis mesomelas*) from semi-arid rangelands in South Africa harbour *Hepatozoon canis* and a *Theileria* species but apparently not *Babesia rossi*. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 24, 100559. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100559>
- Wagner, J.E., 1976. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats.
- Wang, J.L., Li, T.T., Liu, G.H., Zhu, X.Q., Yao, C., 2017. Two tales of *Cytauxzoon felis* infections in domestic cats. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 861–885. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-17>
- Wang, J., Zhang, J., Kelly, P., Zheng, X., Li, M., You, J., Huang, K., Qiu, H., Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Dong, J., Feng, Y., Zhou, J., Wang, C., 2018. First description of the pathogenicity of *Babesia vogeli* in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 253, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.028>
- Wang, J., Liu, J., Yang, J., Liu, Z., Wang, X., Li, Y., Luo, J., Guan, G., Yin, H., 2019. Molecular detection and genetic diversity of *Babesia canis canis* in pet dogs in Henan Province, China. *Parasitol. Int.* 71, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.011>
- Wang, J., Wang, X., Sun, H., Lv, Z., Li, Y., Luo, J., Guan, G., Yin, H., 2020. Molecular evidence of piroplasm infection in companion animals in Hunan Province, China. *BMC Vet. Res.* 16, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02500-6>
- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., Zhang, J., El-Mahallawy, H.S., Kaltenboeck, B., Wang, C., 2014. First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites and Vectors* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-126>

- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., El-Mahallawy, H.S., Kaltenboeck, B., Wang, C., 2015. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs on Costa Rica. *Acta Parasitol.* 60, 21–25. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0003>
- Welc-Faleciak, R., Rodo, A., Siński, E., Bajer, A., 2009. *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 166, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.038>
- Wikander, Y.M., Anantatat, T., Kang, Q., Reif, K.E., 2020a. Prevalence of *Cytauxzoon felis* Infection-Carriers in Eastern Kansas Domestic Cats. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100854>
- Wikander, Y.M., Kang, Q., Reif, K.E., 2020b. Acute *Cytauxzoon felis* Cases in Domestic Cats from Eastern Kansas, a Retrospective Case-Control Study (2006-2019). *Vet. Sci.* 7, 205. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040205>
- Wong, S.S.Y., Poon, R.W.S., Hui, J.J.Y., Yuen, K.Y., 2012. Detection of *Babesia hongkongensis* sp. nov. in a free-roaming *felis catus* cat in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2799–2803. <https://doi.org/10.1128/JCM.01300-12>
- Xu, D., Zhang, J., Shi, Z., Song, C., Zheng, X., Zhang, Y., Hao, Y., Dong, H., Wei, L., El-Mahallawy, H.S., Kelly, P., Xiong, W., Wang, H., Li, J., Zhang, X., Gu, J., Wang, C., 2015. Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China. *Parasites and Vectors* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1120-y>
- Yabsley, M.J., Murphy, S.M., 2006. Molecular Detection and Characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* Species in Cougars from Florida. *J. Wildl. Dis.* 42, 366–374.
- Yabsley, M.J., McKibben, J., Macpherson, C.N., Cattan, P.F., Cherry, N.A., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B., O'Connor, T., Chandrashekar, R., Paterson, T., Perea, M.L., Ball, G., Friesen, S., Goedde, J., Henderson, B., Sylvester, W., 2008. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet. Parasitol.* 151, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.008>
- Yamasaki, M., Inokuma, H., Sugimoto, C., Shaw, S.E., Aktas, M., Yabsley, M.J., Yamato,

- O., Maede, Y., 2007. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Vet. Parasitol.* 145, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.003>
- Ybañez, A.P., Ybañez, R.H.D., Talle, M.F.G., Liu, M., Moumouni, P.F.A., Xuan, X., 2017. First report on *Babesia vogeli* infection in dogs in the Philippines. *Parasitol. Int.* 66, 813–815. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.001>
- Yeagley, T.J., Reichard, M. V., Hempstead, J.E., Allen, K.E., Parsons, L.M., White, M.A., Little, S.E., Meinkoth, J.H., 2009. Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* “Spanish isolate” in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235, 535–539. <https://doi.org/10.2460/javma.235.5.535>
- Zaemi, M., Razmi, G.R., Khoshnegah, J., 2015. The first detection of *Cytauxzoon felis* in a wild cat (*Felis silvestris*) in Iran. *Comp. Clin. Path.* 24, 181–184. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1898-6>
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.* 84, 544–548. <https://doi.org/10.1007/s004360050445>
- Zieman, E.A., Jiménez, F.A., Nielsen, C.K., 2017. Concurrent Examination of Bobcats and Ticks Reveals High Prevalence of *Cytauxzoon felis* in Southern Illinois. *J. Parasitol.* 103, 343–348. <https://doi.org/10.1645/16-133>
- Zieman, E.A., Lawson, T., Nielsen, C.K., Jiménez, F.A., 2020. Within-Season Changes in *Cytauxzoon felis* Parasitemia in Bobcats. *J. Parasitol.* 106, 308–311. <https://doi.org/10.1645/19-173>
- Zou, F., Li, Z., Yang, J., Chang, J., Liu, G., Lv, Y., Zhu, X., Study, T., 2019. *Cytauxzoon felis* in Domestic Cats, Yunnan Province, China, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 353–354.

CAPÍTULO 2

Clinicopathological and molecular characterization of Piroplasm infection in domestic cats from Brazil

Abstract

Feline Piroplasms encompass the genus *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp., and *Theileria* spp. In Brazil, there are few reports regarding these hemoprotozoans, and clinicopathological and molecular data are scarce. This study aimed to characterize the clinical relevance of these parasites through hematological, biochemical and molecular approaches. For this purpose, 171 cats were screened using quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) for piroplasmids based on LSU4 mitochondrial gene, which resulted in an overall prevalence of 36/171 (21.05%). Out of the piroplasmid-positive animals, the prevalence of *Cytauxzoon* sp. was 12/171 (7%), the highest ever found in the country, while 19/171 (11.11%) were positive for *Babesia vogeli*. None of the analyzed cats were positive for *Theileria* spp. *Babesia vogeli* and *Cytauxzoon* sp. LSU4 qPCR sequences showed identities of 97-100% and 99.3%, respectively, to US isolates. The hematological and biochemical findings did not differ statistically between positive and negative cats for piroplasmids. One *Cox-1* and two *Cytochrome B* sequences were obtained from cats positive for *B. vogeli*. Haplotype networking, based on *cox-1* gene, showed only one haplotype (H1) of *B. vogeli* in cats from Brazil, which was also shared with the isolates from the USA and India. The lack of abnormalities in clinical and laboratory parameters suggest that *Cytauxzoon* sp. isolates from Brazil seem not to be as pathogenic as those from the USA, despite the high identity with North American isolates. A low intraspecific variability regarding *B. vogeli* *Cox-1* gene sequences was found.

Keywords: Piroplasmida, *Babesia vogeli*, *Cytauxzoon* sp., Hematology, Biochemistry, Haplotype Network.

1. Introduction

Piroplasmids are among the most important tick-borne agents of domestic and wild animals worldwide (Mehlhorn and Schein 1993; Uilenberg, 2006; Jalovecka et al., 2018). The classification of piroplasms is no longer based only on their morphological features and involved vector, since advances in molecular techniques and phylogenetic analyses have helped to elucidate the relationship between these agents (Lack et al., 2012; Schreeg et al., 2016). Feline piroplasms (Phylum Apicomplexa, Order Piroplasmida) comprise the genera *Babesia* spp., *Theileria* spp. and *Cytauxzoon* spp. (Alvarado-Rybak et al., 2016).

Even though *Babesia* spp. has been reported in domestic cats in almost all continents, except the Antarctic and Australia, the clinical disease has only been observed in cats from South Africa to date (Penzhorn and Oosthuizen, 2020). The molecular occurrence worldwide ranges from 0.8% in Italy (Spada et al., 2014) to 39.5% in Thailand (Do et al., 2021). The clinical disease has been observed in cats infected by different *Babesia* species, namely *B. felis*, *B. leo*, *B. microti*, *B. lengau*, and Western Cape strain of *Babesia* sp., and is characterized by lethargy, anemia, fever, icterus (Bosman et al., 2019), and neurological signs (Bosman et al., 2013).

Cytauxzoon spp. have been molecularly reported in cats from North and South America, Africa, Asia, and Europe (Wang et al., 2017). Among the *Cytauxzoon* species that have been identified thus far, *C. felis* harbors the most concerns as it causes fatal disease in cats, primarily in the United States (Meier and Moore., 2000; Birkenheuer et al., 2006a; Sherrill and Cohn., 2015; Wikander et al., 2020). Although there is an increasing number of cytauxzoonosis cases reported from other continents

over the past decade, it is not always clear what role *Cytauxzoon* sp. play in the clinical findings (Varshney et al., 2009; Maia et al., 2013; Carli et al., 2014; Legroux et al., 2017; Nentwig et al., 2018; Zou et al., 2019). In the United States, bobcats (*Lynx rufus*) are considered the primary wildlife reservoir host for *C. felis* with a molecular prevalence as high as 60-79% in some states (Shock et al., 2011). Similarly in Brazil, *Cytauxzoon* spp. appears to be significantly more prevalent in wild felids (e.g. jaguars and ocelots) than domestic cats (André et al., 2009, 2014, 2015; Furtado et al., 2017). As bobcats do not exist in South America, these wild felids are suspected to function as reservoirs for *Cytauxzoon* spp. in Brazil (André et al., 2009; Malzoni et al., 2017; de Sousa et al., 2018). Nonetheless, fatal cases of clinical cytauxzoonosis in Brazil has been reported in a lioness and its cub (Peixoto et al., 2007) but not in domestic cats.

Recently, *Theileria* sp. has emerged as the third piroplasmid species occurring in cats, even though the clinical significance is still unknown. Until now, *Theileria* spp. has been molecularly detected in cats from Brazil (André et al., 2014; André et al., 2015) and Chile (Sacristán et al., 2019).

Despite the detection of piroplasmids in cats from Brazil (Maia et al., 2013; André et al., 2014; André et al., 2015; Malheiros et al., 2016; André et al., 2017; Pedrassani et al., 2019), the hematological and biochemical abnormalities associated with these infections have not been assessed to date. In addition, molecular data are still incipient and based only on short fragments of the 18S rRNA. Therefore, in order to shed some light on the clinical significance of piroplasmid infection in cats from Brazil, the present work aimed to investigate the occurrence, clinicopathological disorders as well as molecular features associated with piroplasmid infection in cats from Midwestern Brazil.

2. Material and Methods

2.1 Animals and sampling sites

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Brasilia, under the protocol number UnB Doc 40/2017. Between June/2016 and September/2017, 171 domestic cats (*Felis catus*) were selected by convenience from animals attended in the urban area of Brasília (15° 47' 38" S 47° 52' 58" O) from private clinics of the Federal District (FD) or the Veterinary Hospital of the University of Brasilia, regardless of age, gender, breed, and health status. All owners were required to fill out a form regarding the reason for the appointment, the habits of each animal, the presence of ectoparasites, as well as the housing type (house or apartment), outdoor access, and contact with other dogs or cats.

2.2 Hematological and biochemical analysis

Blood samples were collected from all cats, either from cephalic or femoral veins, into ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA)-coated tubes for complete blood count (CBC) and DNA extraction, and tubes containing a clotting activator for biochemical analysis. All the hematological and biochemical analyses were performed at the Veterinary Clinical Pathology Laboratory, from the College of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF.

The CBC and the concentration of hemoglobin were obtained using an automatic cell counter (ABC Vet Horiba® ABX diagnostics, Brazil). The Packed Cell Volume (PCV) was determined by microhematocrit centrifugation. Differential leukocyte counts were obtained by direct observation of 100 leukocytes in Diff-quick (Newprov®) stained blood smears using a light microscope (CX40RF200, Olympus,

Japan). All blood smears were checked for the presence of platelet aggregates and hemoparasites inclusions. Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated. Plasma protein concentration was determined by refractometry (models SZJ-D and RTP-20 ATC).

Serum samples were analyzed for activity of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total serum protein, Albumin, Gamma-glutamyl transferase (GGT), urea and creatinine in an automatic biochemistry analyzer (Cobas c111 Roche®). FIV and FeLV tests were performed using Idexx® manufactured kits.

The reference interval of CBC and biochemistry analysis followed Weiss and & Wardrop, 2011, and Kaneko et al., 2008, respectively. Hematological abnormalities were considered as anemia (PCV < 24%, and/or Red blood cells < 5,0 x10⁶/μL and/or Hemoglobin < 8,0 g/dL), leukopenia (White Blood Cells < 5.500 x10³/μL) or thrombocytopenia (Platelets < 300.000 x10³/μL).

2.3 Molecular analysis

2.3.1 DNA extraction

DNA was extracted from EDTA-whole blood samples using a commercial kit (Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, Promega Corporation®, WI, EUA), according to the manufacturer's recommendations. The DNA samples concentration and quality were evaluated by optical spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific®). DNA was stored at -20°C until PCR analysis.

A housekeeping PCR targeting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene was performed to confirm the presence of mammal genomic DNA (Birkenheuer et al., 2003).

2.3.2 PCR assays

All quantitative PCR assays (qPCR) were performed at the Vector-Borne Disease Diagnostic Laboratory (College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, U.S.A.). All samples were then screened for the presence of piroplasmids DNA using a broad-range qPCR assay targeting a 108-173bp fragment of the mitochondrial large subunit (mtLSU) DNA (Qurollo et al., 2017). The qPCR was performed using the primers BAB-LSU4 F (ACCTGTCAARTTCCTTCACTAAMTT), BMIC-LSU4 F (TTGCGATAGTAATAGATTTACTGC) and BAB-LSU4 R (TCTTAACCCAACTCACGTACCA). Briefly, the amplification reaction was performed using the Thermocycler Biorad CFX96 Real-Time System C1000 Touch. The qPCR assays contained 12,5 µl of SSO Advanced SYBR Universal Supermix 2X (BioRad, Hercules, USA), 5µL DNA template, 0,3 µL of BAB primers (0,6 µM), 0,2 µL of BMIC primer (0,4 µM) and molecular grade water to a final volume of 25 µL. The amplification protocol used was as follows: 3 min at 98°C, followed by 40 cycles of 15 s at 98°C, 15 s at 60°C and 15 s at 72°C. The melting curve was acquired using 0.5 °C steps, with holds of 2 s, from 65 to 95 °C. The results were assessed through observation of amplification curves. In all qPCR assays, plasmids encoding mtLSU fragments of *B. microti-like* and *B. odocoilei* were used as positive controls, and a negative dog DNA plus no template control (NTC) were used as negative controls. All amplicons were submitted to an electrophoresis gel on 2% agarose gel stained with *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc, US), regardless of being positive or negative on qPCR. Animals were classified according to the results of the qPCR, as groups: P (positives); N (negative); B (*Babesia* spp. positive); C (*Cytauxzoon* spp. positive).

Subsequently, the qPCR-positive samples were analyzed at the Veterinary Molecular Biology Laboratory from the College of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, FD. Those samples were subjected to further molecular characterization using conventional PCR (cPCR) assays targeting four molecular markers, as shown in **Table 1**. The cPCR reactions described herein were adapted from the original sources for reaction setup and cycling. Amplifications of all rounds were performed in a total volume of 25 μ L containing 1 μ L of template DNA, except for the amplification of *CytB* (Cythochrome B) sequences that were carried out using 2 μ L of DNA for the first round. Amplified DNA was electrophoresed and visualized using and UV illumination on 1,5% agarose gel stained with ethidium bromide. For all cPCR assays, DNA positive controls were obtained from naturally infected dogs (MZ648124), and, for negative controls, MilliQ® Ultra-pure water (Sigma-Aldrich Inc, Germany) was used. All samples were run in duplicate.

Table 1. Target genes used in cPCR assays for molecular characterization of qPCR (LSU)-positive cat blood samples

Target gene	Target agent	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon Length (bp)	Reference
18S rRNA	Piroplasmids	F- RGGCTCATTACAACAGTTATAG	58	~830	(Jefferies et al., 2007a)
		R- CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC			
		F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC	62	~790	
		R- GGACTACGACGGTATCTGATCG			
18S rRNA	Cytauxzoon felis	F- GCGAATCGCATTGCTTTATGCT	59	284	(Birkenheuer et al., 2006b)
		R- CCAATTGATACTCCGGAAAGAG			
Cytochrome c oxidase subunit I (Cox-1)	Babesia spp.	F- ATWGGATTYTATATGAGTAT	45	~1250	(Hrazdilová et al., 2019)
		R- ATAATCWGGWATYCTCCTTGG			
		F- TCTCTWCATGGWTTAATTATGATAT	49	~980	
R- TAGCTCCAATTGAHARWACAAAGTG					
Cytochrome B (CytB)	Babesia spp.	F- TGGTCWTGGTATTCWGGAATG	50	~700	(Hrazdilová et al., 2019)
		R- AAGMYARTCTYCCTAAACATCC			
		F- RATKAGYTAYTGGGGAGC	48	~580	
		R- GCTGGWATCATWGGTATAC			

2.3.3 Amplicon purification, sequencing and BLAST analysis

Amplicons from all qPCRs positive samples were submitted for bidirectional Sanger sequencing to confirm the results (GENEWIZ, Inc., Raleigh, NC). Regarding the cPCR assays, the samples were previously purified using the Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up purification kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the purified amplicons were sequenced at the Center of Biological Resources and Genomic Biology (CREBIO), Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Geneious Prime (v.2020.0.3) was used to align and analyze DNA results with reference sequences from GenBank. The primer regions were submitted by manual trimming. Identity, query coverage, and e-values were assessed by the BLASTn tool (using default parameters), available in the NCBI GenBank database (Altschul et al., 1990).

Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, under the accession numbers: [MZ576191](#), [MZ577086](#) and [MZ577087](#).

2.3.4. Haplotype network

TCS Network was performed in PopART v.1.7 software using all available sequences of *cox 1* from *B. vogeli* deposited in GenBank, and the sequences obtained in the present study. DnaSP v. 6 was applied to calculate nucleotide diversity (π), number of haplotypes (h), diversity of haplotype (Dh), average number of nucleotide differences (K) and number of segregating sites (S).

2.4. Statistical analysis

The effects of age, test result, sex, type of residence, previous life on the street, time in shelters, contact with dogs, results of FIV and FeLV tests, and

ectoparasites on the test result (positive or negative) was tested using a General Linear Model (PROC GLM) and means compared using Duncan's Multiple range Test, with $P < 0.05$ used as a significant difference. Transformations by logarithm were carried out if the coefficient of variance was greater than 25%. The effect of age, test result, sex, type of residence, previous life on the street, time in shelters, contact with dogs, results of FIV and FeLV tests, and ectoparasites of the animal on the test outcome (0 = negative and 1 = positive) were evaluated using logistic regression (PROC LOGISTIC). A chi-square test of frequencies was used to see the effect of the test result on age, test result, sex, type of residence, previous life on the street, time in shelters, contact with dogs, results of FIV and FeLV tests, and ectoparasites, anemia, leukopenia and thrombocytopenia (PROC FREQ). All data were analyzed in SAS (Statistical Analysis System Institute, Cary, North Carolina).

3. Results

3.1 Epidemiological and clinical findings

The overall molecular occurrence for piroplasmids assessed by LSU-based qPCR was 36/171 (21.05%). Out of the 36 positive cats, while *Cytauxzoon* sp. was detected in 12/171 (7%) animals, 19/171 (11.11%) were positive for *Babesia* sp. (**Figure 1**). None of the cats were positive for *Theileria* spp. by qPCR analysis. No co-infections could be detected with the employed qPCR assay.

Almost all clinical parameters did not show a significant statistical difference between positive (P) versus negative (N) animals, even when comparing with the groups positive for *Babesia* spp. (B) or *Cytauxzoon* spp. (C) infected cats. Nevertheless, spayed male animals showed the highest prevalence in all groups, with 14/35 (40%) for the P group, 6/18 (33.33%) for group B and 7/12 (58.33%) for group C. Regarding the type of residence and lifestyle, most animals of group P lived in apartment 20/34 (58.82%) and

29/35 (83.86%) had an indoor lifestyle. Most animals from all groups had contact with other cats, with 24/35 (68.57%) belonging to the P group, while cats without contact with dogs comprised 29/34 (85.29%) of the same group. Almost a third of group P cats (31.25%) originated from shelters. Group P also showed a higher frequency of cats with no ectoparasites, with values of 26/35 (74.29%), as well as negative results on retroviral tests: 21/35 (60%) for FIV and 20/35 (57.14%) for FeLV. The only statistical difference between group P compared to group N was related to age ($p=0.0481$). While animals older than 2 years had the highest frequency in the P group, cats younger than 1 year were the majority in the N group, with 42/126 (33.33%) prevalence (**Table 2**). A summary of the clinicopathologic characteristics of the qPCR-positive cats is shown in **Supplementary material 1**.

3.2 Hematological and biochemistry profile

Similar to the clinical findings, only a few significant associations were observed on the blood test profile. Lymphopenia showed a statistical trend ($p=0.09$; $R^2=0.29$; $CV=83.21\%$) for the P group compared to the N group (**Table 3**). There was no statistical difference between P and N groups regarding the biochemistry panel. Regarding anemia, leukopenia and thrombocytopenia frequencies, no significant differences were found between the P and N groups (**Table 4**), or even as for the comparison between the B and C groups (**Table 5**). Nevertheless, cats without anemia had the highest prevalence for both groups - P and N - with 33/35 (94.29%) and 116/122 (95.08) of frequency, respectively. Likewise, the frequencies of cats with no anemia were 17/18 (94.44%) and 11/12 (91.67%) in B and C groups, respectively. The absence of leukopenia in all cats from P group was also observed. Regarding platelet counts, 63/120 (52.50%) of animals from the N group showed a decrease in platelet number, whereas

most of the cats from the P group [21/34 (61.76%)] present platelet counts within the normal range. Intra-erythrocytic inclusions suggestive of piroplasmids were not found in sampled cats' blood smears.

3.3 Sequencing analysis

All 30 LSU sequences obtained showed 97-100% identity to *B. vogeli* (GenBank accession number KC207825.1) or *C. felis* (KC207821.1) sequences, both from USA isolates. The identity among the *Babesia* sequences obtained in this study ranged from 99.3% to 100%, while *Cytauxzoon* sp. sequences shared 99.3% nucleotide identity. All qPCR-positive samples were negative in cPCR assays for *Babesia* spp. and *Cytauxzoon* spp. based on 18S rRNA cPCRs. Cycle threshold (Ct) values ranged from 33.32 to 39.62, with almost 50% of samples with Ct values higher than 37 (Table 6). Concerning the mitochondrial molecular markers, we obtained one *B. vogeli* *cox-1* sequence (**MZ576191**) and two *B. vogeli* *Cyto B* sequences (**MZ577086**; **MZ577087**). The obtained *cox1* and *cytB* sequences showed 100% identity to *B. vogeli* isolates from USA (KC207825.1) and China (MK888706.1) in BLASTn analysis, respectively (**Table 7**).

Unfortunately, because of few sequences of *cytB* gene in GenBank (MK888706.1 and MK888703.1 - China, and KC207825.1 - USA), and the 100% Identity among them, we were unable to perform the haplotype network using these sequences. On the other hand, The *Cox-1* based Haplotype network showed only one haplotype (H1) of *B. vogeli* in Brazil (comprising one sequence from a cat of this study), which is also shared with dog isolates from the EUA (n=1) and India (n=4). Conversely, 6 different haplotypes were described in dogs from India (**Figure 2 and Supplementary material 2**). The results of DNaSP analysis were as follow: Number of polymorphic (segregating) sites= 9; Nucleotide diversity (Pi)=0.00466; Average number of nucleotide

differences (k)= 1.872; Haplotype (gene) diversity (Hd)=0.718; Variance of Haplotype diversity=0.01636; Standard Deviation of Haplotype diversity=0.12

Supplementary material 1 – Clinicopathological findings for the piroplasmid-qPCR positive cats at the time of blood sampling.

Sample	qPCR	Appointment reason	FIV	FeLV	Hematology	Biochemistry
1	<i>Cytauxzoon sp.</i>	CKD	NT	NT	N, ↑seg neut	↑ creat
2	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Worms, conjunctivitis	NT	NT	-	-
3	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Worms, conjunctivitis	NT	NT	↓platelets	-
4	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Anorexia, vomit, prostration	Neg	Neg	anemia, ↑L, N, ↓platelets	↑ creat, ↑ urea
5	Poor Identity	Check up	Neg	Neg	↓leukocytes,	-
6	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Claudication	Neg	Neg	*	*
7	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Epilepsy	Neg	Neg	*	*
8	<i>Babesia vogeli</i>	Spaying	Neg	Neg	*	*
9	<i>Babesia vogeli</i>	Spaying	Neg	Neg	*	*
10	<i>Babesia vogeli</i>	Check up	NT	NT	*	↑ ALT
11	<i>Babesia vogeli</i>	Check up	NT	NT	↓platelets	*
12	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Cholangiohepatitis	Neg	Neg	↓lymp, ↓platelets	↑ ALT, ↑ ALP
13	<i>Babesia vogeli</i>	Nephrolithiasis	NT	NT	↓platelets	↑ creat, ↑ urea
14	<i>Babesia vogeli</i>	CKD	Neg	Neg	*	↑ creat, ↑ urea
15	Poor Identity	Allergic dermatitis	Neg	Neg	↓leuk, ↓lymp ↓platelets	↑ creat
16	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Periodontal disease	NT	NT	↓platelets	↓alb
17	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Cholangiohepatitis	NT	NT	↓platelets	*
18	<i>Babesia vogeli</i>	Spaying	NT	NT	↓lymph	*
19	<i>Babesia vogeli</i>	Hepatic lipidosis	Neg	Neg	↓lymph, ↑TPP, ↓platelets	↑ ALT, ↑ AP, ↓alb
20	<i>Babesia vogeli</i>	Check up	NT	NT	*	*
21	<i>Babesia vogeli</i>	FeLV, hemolytic anemia	Neg	Pos	anemia, ↑MCV, ↓platelets	↓alb
22	<i>Babesia vogeli</i>	Spaying	NT	NT	↓platelets	*
23	<i>Babesia vogeli</i>	Spaying	Neg	Neg	↑ Baso	*
24	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Spaying	Neg	Neg	↓lymph	*
25	<i>Cytauxzoon sp.</i>	Uveite	Neg	Neg	↓lymp, ↓platelets	↓alb
26	<i>Babesia vogeli</i>	Periodontal disease	Neg	Neg	↓ leuk, ↓lymph	↑ TP
27	<i>Babesia vogeli</i>	Gastritis	Neg	Neg	*	*
28	<i>Babesia vogeli</i>	Vomit	Neg	Neg	↑E, ↓lymph	*
29	<i>Babesia vogeli</i>	-	-	-	-	-
30	<i>Babesia vogeli</i>	Feline triad	NT	NT	↑band neut, ↓lymph, ↓platelets	↑ creat, ↑ ALT, ↑ AP, ↓alb
31	<i>Cytauxzoon sp.</i>	CKD	Neg	Neg	↓lymph, ↓platelets	↑ creat, ↑ Urea
32	<i>Babesia vogeli</i>	Gingivostomatitis	Pos	Neg	↑L, seg neut, ↓lymp	↓alb
33	<i>Babesia vogeli</i>	Atopy	Neg	Neg	↑E	↓alb
34	Poor quality	Heart disease	Neg	Neg	*	*
35	Poor quality	Check up	NT	NT	↓lymph, ↓platelets	*
36	Poor Identity	IMHA – follow up	Neg	Neg	↓lymph, ↑E	*

CKD: Chronic kidney disease; IMHA: Immune-mediated hemolytic anemia; NT: Not tested; Neg: negative; Pos: positive; FIV: Feline Immunodeficiency Virus; FeLV: Feline Leukemia Virus

Legend:

- : missing data

L: leukocytosis; M: Monocytosis; lymph: lymphocytes; leuk: leukocytes; TPP: Total plasma protein; MCV: Mean Corpuscular Volume; Baso: basophils; E: Eosinophils; Band neut: band neutrophils; Seg neut: Segmented neutrophils; * within the normal range

Creat: creatinine; U: urea; ALP: Alkaline phosphatase; Alb: albumin; TP: Total protein

Table 2 - Frequency data on piroplasmid-qPCR and positive cats versus epidemiological features

Variable/total	Negative cats n (%)	Positive cats n (%)		
		Any piroplasma positive	Babesia vogeli	Cytauxzoon sp.
Sex	128 (78.53)	35 (21.47)	18 (60)	12 (40)
Female	26 (20.31)	8 (22.86)	3 (16.67)	2 (16.67)
Spayed Female	35 (27.34)	6 (17.14)	5 (27.78)	1 (8.33)
Male	25 (19.53)	7 (20)	4 (22.22)	2 (6.67)
Spayed Male	42 (32.81)	14 (40)	6 (33.33)	7 (58.33)
Age(years)	126 (80.25)	31 (19.75)	16 (59.26)	11 (40.74)
0-1	42 (33.33)*	3 (9.68)	1 (6.25)	2 (18.18)
>1-2	13 (10.33)	6 (19.35)	3 (18.75)	2 (18.18)
>2-7	30 (23.81)	11 (35.48)*	5 (55.56)	4 (36.36)
>7	41 (32.54)	11 (35.48)*	7 (43.75)	3 (27.27)
Type of residence	124 (78.48)	34 (21.52)	18 (62.07)	11 (37.93)
House	48 (38.71)	14 (41.18)	8 (44.44)	4 (36.36)
Apartment	74 (59.68)	20 (58.82)	10 (55.56)	7 (63.64)
Hotel	1 (0.81)	0	0	0
Farm	1 (0.81)	0	0	0
Lifestyle	125 (78.13)	35 (21.88)	18 (60)	12 (40)
Outdoor	21 (16.80)	6 (17.14)	3 (16.67)	3 (25)
Indoor	104 (83.20)	29 (83.86)	15 (83.33)	9 (75)
Origin from a shelter?	11 (77.62)	32 (22.38)	16 (57.14)	12 (42.86)
Yes	54 (48.65)	10 (31.25)	8 (50)	2 (16.67)
No	57 (51.35)	22 (68.75)	8 (50)	10 (83.33)
Has contact with other cats?	125 (78.13)	35 (21.88)	18 (60)	12 (40)
Yes	92 (73.60)	24 (68.57)	13 (72.22)	8 (66.67)
No	33 (26.40)	11 (31.43)	5 (27.78)	4 (33.33)
Has contact with dogs?	124 (78.48)	34 (21.52)	17 (58.62)	12 (41.38)
Yes	29 (23.39)	5 (14.71)	4 (23.53)	0
No	95 (76.61)	29 (85.29)	13 (76.47)	12 (100)
Has ectoparasites?	125 (78.13)	35 (21.88)	18 (60)	12 (40)
Yes	15 (12)	4 (11.43)	1 (5.56)	2 (16.67)
No	89 (71.20)	26 (74.29)	13 (72.22)	9 (75)
Not observed	21 (16.80)	5 (14.29)	4 (22.22)	1 (8.33)
FIV test	125 (78.13)	35 (21.88)	18 (60)	12 (40)
Positive	0	1 (0.63)	1 (5.56)	0
Negative	78 (62.40)	21 (60)	10 (55.56)	7 (58.33)
Not tested	47 (37.60)	13 (37.14)	7 (38.89)	5 (41.67)
FelV test	125 (78.13)	35 (21.88)	18 (60)	12 (40)
Positive	9 (7.20)	2 (5.71)	1 (5.56)	1 (8.33)
Negative	69 (55.20)	20 (57.14)	10 (55.56)	6 (50)
Not tested	47 (37.60)	13 (37.14)	7 (38.89)	5 (41.67)

* p=0.0481

Table 3 - Mean values of the hematologic and biochemistry data on piroplasmid-qPCR negative and positive cats.

Variable	Negative cats	Positive cats	R2	CV
Hematologic features				
Red blood cells (x10 ⁶ /μL)	8.22	8.15	0.159623	18.49
Hemoglobin (g/dL)	12.21	12.53	0.148678	17.06
Hematocrit (%)	36.23	37.19	0.160024	18.14
MCV (fL)	44.07	45.62	0.216356	6.49
MCHC (%)	33.76	33.73	0.093682	5.52
White blood cells (x10 ³ /μL)	9.564	10.387	0.161343	37.83
Band neutrophils (/μL)	121	49	0.955936	157.83
Segmented neutrophils (/μL)	8.906	9.404	0.650666	60.18
Lymphocytes (/μL)	3.160*	1.897*	0.290762	83.21
Monocytes (/μL)	227	123	0.142415	236.90
Eosinophils (/μL)	658	616	0.219927	111.62
Basophils (/μL)	107	28	0.283982	311.51
Platelets (x10 ³ /μL)	294.548	342.400	0.267763	41.60
Total plasma protein (g/dL)	7.4	7.7	0.283937	8.92
Biochemistry				
ALT (UI/L)	90.27	128.53	0.206954	138.65
Alkaline phosphatase ALP (UI/L)	48.36	122.82	0.411255	171.78
Creatinine (mg/dL)	1.28	1.44	0.295504	25.10
Urea (mg/dL)	92.50	91.13	0.597559	68.63
Total protein (g/dL)	7.52	8.47	0.391850	16.30
Albumin (g/dL)	3.21	2.71	0.521470	27.20
Gamma glutamyltransferase (UI/L)	3.75	3.00	0.471179	104.43

R2 – coefficient of determination; CV – coefficient of variation; *Statistical trend: P=0.0928

Table 4 - Frequency data on piroplasmid-qPCR negative and positive cats versus hematological abnormalities

qPCR result/Variable n (%)	Anemia		Leukopenia		Thrombocytopenia	
	No	Yes	No	Yes	No	Yes
Negative cats	116 (95.08)	6 (4.92)	113 (92.62)	9 (7.38)	57 (47.50)	63 (52.50)
Positive cats	33 (94.29)	2 (5.71)	30 (85.71)	5 (14.29)	21 (61.76)	13 (38.24)
Total	149 (94.90)	8 (5.10)	143 (91.08)	14 (8.92)	78 (50.65)	76 (49.35)

Table 5 - Frequency data on piroplasmid-qPCR results versus hematological abnormalities

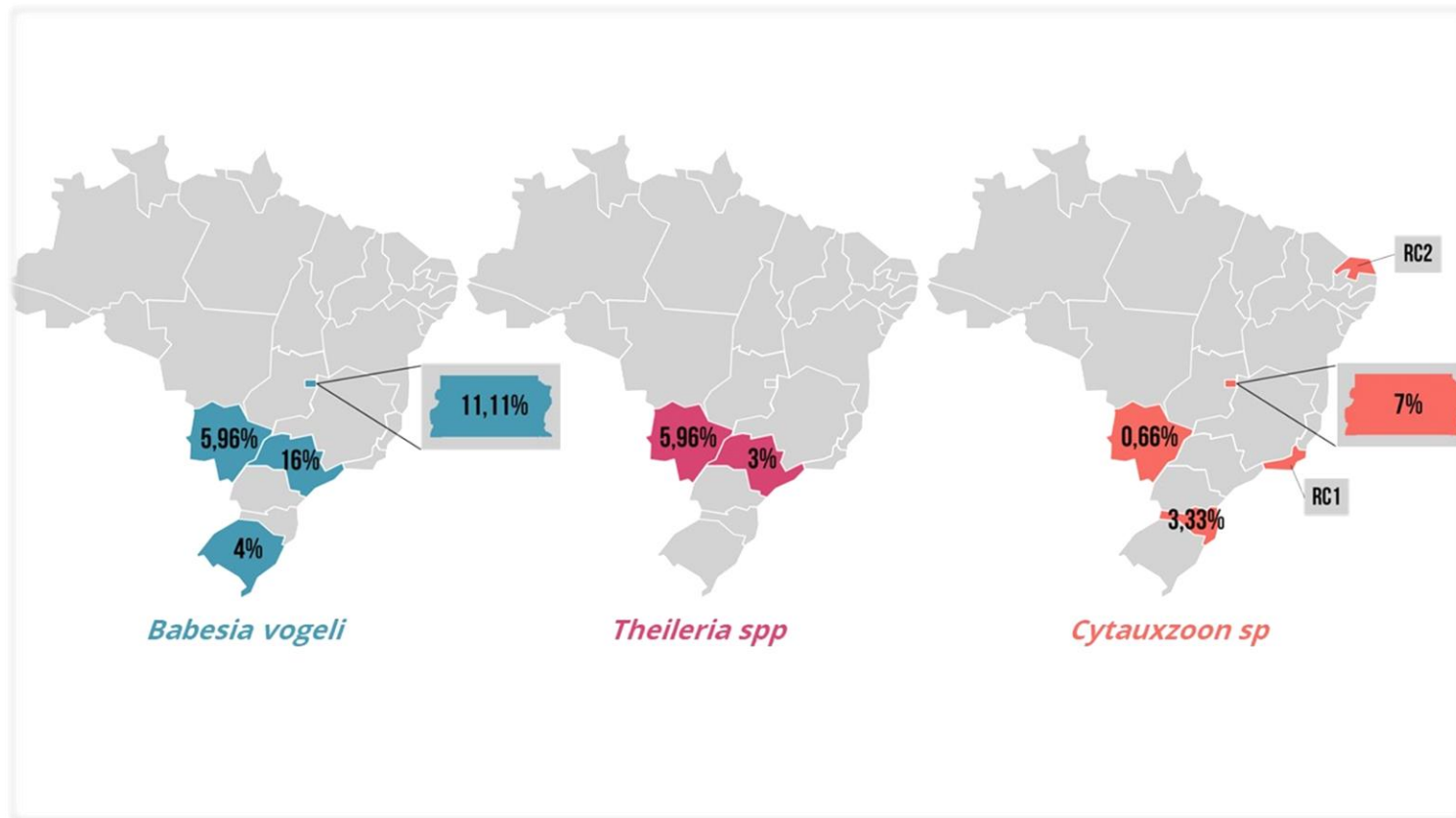
qPCR result/Variable n (%)	Anemia		Leukopenia		Thrombocytopenia	
	No	Yes	No	Yes	No	Yes
<i>Babesia vogeli</i>	17 (94.44)	1 (5.56)	17 (94.44)	1 (5.56)	13 (72.22)	5 (27.78)
<i>Cytauxzoon</i> sp.	11 (91.67)	1 (8.33)	12 (100)	0	6 (50)	6 (50)
Total	28 (93.33)	2 (6.67)	29 (96.67)	1 (3.33)	19 (63.33)	11 (36.67)

Table 6. Cycle threshold (CT) values for positive samples obtained on piroplasmid-qPCR

Samples's number	Sequencing results LSU	LSU4 CT
1	<i>Babesia vogeli</i>	33.32
2	<i>Babesia vogeli</i>	33.89
3	<i>Babesia vogeli</i>	34.44
4	<i>Cytauxzoon felis</i>	34.73
5	<i>Babesia vogeli</i>	35.07
6	<i>Babesia vogeli</i>	35.44
7	<i>Babesia vogeli</i>	35.57
8	<i>Cytauxzoon felis</i>	35.58
9	<i>Babesia vogeli</i>	35.64
10	<i>Cytauxzoon felis</i>	35.86
11	<i>Cytauxzoon felis</i>	36.42
12	<i>Cytauxzoon felis</i>	36.55
13	<i>Cytauxzoon felis</i>	36.88
14	<i>Babesia vogeli</i>	37.31
15	<i>Babesia vogeli</i>	37.33
16	Poor quality	37.42
17	Poor quality	37.52
17	<i>Babesia vogeli</i>	38.01
19	<i>Babesia vogeli</i>	38.13
20	Poor quality	38.46
21	<i>Cytauxzoon felis</i>	38.55
22	<i>Babesia vogeli</i>	38.57
23	<i>Cytauxzoon felis</i>	38.84
24	<i>Babesia vogeli</i>	39.11
25	<i>Babesia vogeli</i>	39.30
26	<i>Cytauxzoon felis</i>	39.32
27	<i>Babesia vogeli</i>	39.46
28	<i>Babesia vogeli</i>	39.57
29	<i>Cytauxzoon felis</i>	39.62
30	<i>Babesia vogeli</i>	*
31	<i>Cytauxzoon felis</i>	*
32	Poor quality	*
33	<i>Babesia vogeli</i>	*
34	<i>Babesia vogeli</i>	*
35	Poor quality	*
36	<i>Cytauxzoon felis</i>	*

*Samples only positive on electrophoresis gel

Figure 1 Occurrence of piroplasmids in domestic cats from Brazil.

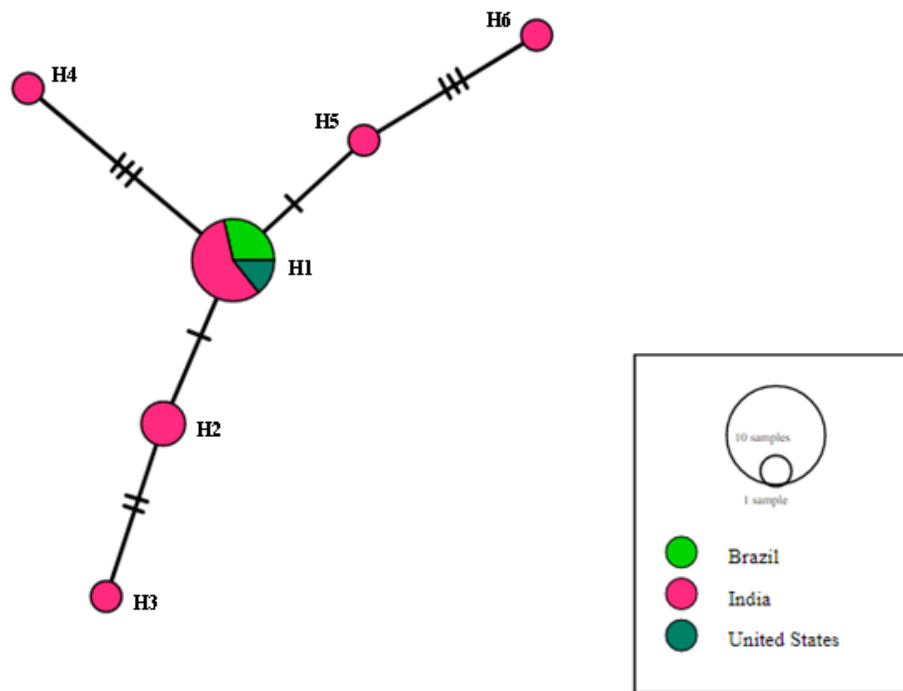


Legend: In blue, pink and orange, the prevalences of *Babesia vogeli*, *Theileria spp.* and *Cytauxzoon felis*, respectively. Brazil's prevalence: (Maia et al., 2013; André et al., 2014; André et al., 2015; Malheiros et al., 2016; Pedrassani et al., 2019).

Table 7 – Summary of *Babesia vogeli* sequences data according to their molecular marker

Animal ID	GenBank accession number	Target gene	Sequence Length (bp)	Identity (%)	Query Cover (%)	Closest GenBank entry and Identity
A	MZ576191	<i>Cox-1</i>	617	100%	100%	KC207825.1 - EUA
B	MZ577086	<i>CytB</i>	528	100%	100%	MK888706.1 - China
C	MZ577087	<i>CytB</i>	548	100%	100%	MK888706.1 - China

Figure 2. TCS Network of twenty *B. vogeli* - partial sequences (402 nt) from *Babesia vogeli* performed in PopART v.1.7 software. The size of circles corresponds to the haplotype frequency; hatch marks represent SNPs separating haplotypes.



Supplementary material 2 – Haplotype characterization for COX1 sequences of *Babesia vogeli*

Haplotype number	Gene Bank Access numbers	Origin	Host
H1	MZ576191	Brazil	Domestic cat
H1	KX426022	Brazil	Domestic dog
H1	KC207825	EUA	Domestic dog
H1	MN176012; MN176014; MN176017; MN176018	India	Domestic dog
H2	MN176013; MN176016	India	Domestic dog
H3	MN176020	India	Domestic dog
H4	MN176011	India	Domestic dog
H5	MN176015	India	Domestic dog
H6	MN176019	India	Domestic dog

4. Discussion

In this study, we characterized the infection by Piroplasmids in cats from Brazil, for the first time, combining epidemiological, clinicopathological, and molecular approaches. The lack of abnormalities in clinicopathological parameters allows us to infer important points.

Firstly, the absence of statistically significant difference regarding the genus and retroviral status among all groups agree with results from previous studies, in which tick borne-diseases in cats were not associated with these parameters (Carli et al., 2012; Hartmann et al., 2013; Lloret et al., 2015; F. Zou et al., 2019; Moghaddam et al., 2020). However, the predominance of adult cats in the positive group, as well as the majority of animals living in apartments and not having an outdoor lifestyle, contrasted with the results found in the abovementioned studies. This can be explained because adult cats have a longer time of exposure to blood-sucking arthropods (Ravagnan et al., 2017; Do et al., 2021) and animals with an indoor lifestyle were the most prevalent in our study for both groups (infected and not infected). Recently, it has been shown that the prevalence of *Cytauxzoon felis*-carriers among feral (outdoor lifestyle) and owned cats (indoor lifestyle) was not significantly different, probably due to pervasive habits of the tick vectors from the studied areas (Wikander et al., 2020a).

A relatively high frequency of cats that had contact with other cats (68.57%), associated with the frequency of almost a third of cats originating from shelters (31.25%), observed in the P group, could increase the chances of previous contact with ectoparasites, as the piroplasmids detected in this study are supposedly transmitted by ticks. Nevertheless, we did not find a high frequency of ectoparasites as ticks in animals from the P group. This may reflect a failure to detect these vectors during the medical examination or because of

misleading perception by the owners. Another possibility could be related to the grooming behavior of cats, which could enable ingesting of infected ticks (Birkenheuer et al., 2006b; Eberhardt et al., 2006; André et al., 2014). This in turn, would make it difficult to detect ectoparasites or even promote an alternative oral route of infection. In agreement with this, some studies reported the detection of *Babesia canis* DNA in feces (Hornok et al., 2015), heart (Alexandra et al., 2019) and ticks of bats (Hornok et al., 2016). A recent article showed, by experimental infection, the presence of *Babesia canis* DNA in rodent tissues after oral inoculation of positive *Babesia canis*-infected ticks (Corduneanu et al., 2020). 18S rRNA sequences closely related to *B. vogeli* was also found in the spleen of rodents in Midwestern Brazil (de Sousa et al., 2018). These findings raised the possibility of alternative transmission routes for piroplasmid infection, such as the ingestion of infected ticks through grooming or even predation of *Babesia vogeli*-carrying rodents as a plausible route of infection, since cats show more consistently predator behavior when compared to dogs. These hypotheses should be proven with experimental studies of transmission in live animals, aiming at investigating whether the detected DNA of piroplasmids found in ticks or tissues of susceptible animals really means that these agents are infective to those animals (Uilenberg et al., 2018). Other alternative transmission routes of piroplasmids are blood exchange in fighting animals, as in *Babesia gibsoni* infections (Jefferies et al., 2007b; Yeagley et al., 2009) and blood transfusions (Hartmann et al., 2013; Nentwig et al., 2018a). Actually, the vector of *Cytauxzoon* sp. in cats from Brazil remains unknown (André et al., 2015; de Sousa et al., 2018), as ticks usually are not found in infected animals (André et al., 2009). Likewise, the vector for *Babesia vogeli* in cats has not yet been identified (Hartmann et al., 2013).

To the best of our knowledge, this study describes the highest (7%; 12/171) molecular prevalence of *Cytauxzoon* sp. in Brazil to date, since previous studies found no more than 3.3% (1/30) in cats from Southern Brazil (Pedrassani et al., 2019) and only 0,66% in Mato Grosso do Sul, also in Midwestern Brazil (André et al., 2015). Regarding *B. vogeli*, we identified 11.11% (19/171) of infected cats, a similar rate to a previous study from Southeast Brazil 16% (6/37), and also higher than other places in the country (André et al., 2015; Malheiros et al., 2016). However, cats from Brazil showed a lower rate of positivity for *Babesia* sp. when compared to that found in Thailand (39.5% - 147/372)(Do et al., 2021), as well as a lower prevalence of *Cytauxzoon* sp. when compared to cats from the USA [30.3% (27/89)] (Brown et al., 2010). These worldwide differences could depend on some epidemiological features of the vectors (type and prevalence in each studied region) (Hamel et al., 2012), environmental conditions (geographic variation) (Díaz-Regañón et al., 2017), the lifestyle of sampled cats (indoor versus outdoor cats), diagnostic methods (Quantitative PCR-qPCR or Conventional PCR-cPCR) (Do et al., 2021), phase of infection (molecular tests provide evidence of likely active infection, and fluctuating parasitemia in carrier cats could affect the identification of reservoir hosts; Kidd, 2019; Wikander et al., 2020a), as well as sample size (surveys with a high number versus a low number of susceptible animals) used in each study (Do et al., 2021).

Herein, the qPCR performed probably improved the detection of those Piroplasms, as we were unsuccessful to amplify most samples on cPCR or in nPCR (for *Babesia*) or cPCR (for *Cytauxzoon*) assay based on 18S rRNA. That could reflect the higher sensibility of the Real Time PCR technique compared to the cPCR (Gadkar and Fillion, 2014; Persichetti et al., 2016; Quorollo et al., 2017). Indeed, most previous studies from Brazil that have found lower prevalences of such agents used cPCR for the diagnosis (Maia et al., 2013; André et al., 2015; Malheiros et al.,

2016; André et al., 2017; Pedrassani et al., 2019), and this is the first report of the detection of such piroplasm from Brazil using a mitochondrial qPCR.

Regarding the clinicopathologic features, we did not identify alterations compatible with feline tick-borne diseases. For the few cases with characteristic clinical signs, such as a *B. vogeli*-infected cat presenting hemolytic anemia, Feline Leukemia Virus (FeLV) was also detected. Regarding *Cytauxzoon sp.* infected animals, a Chronic Kidney Disease (CKD) was identified in an animal presenting anorexia, vomit and prostration. No biochemistry abnormalities were found in another cat with Cholangiohepatitis. Likewise, the lack of anemia, leukopenia or thrombocytopenia was seen in most animals from the P group. These findings disagree with those of the described clinical signs associated with *C. felis* infection in domestic cats from the USA, where that protozoan is considered to be very pathogenic (Birkenheuer et al., 2006b; Hartmann et al., 2013; Sherrill and Cohn, 2015; Lloret et al., 2015). On the other hand, our study is in agreement with studies elsewhere, such as Brazil (André et al., 2017; Pedrassani et al., 2019), Asia (Zou et al., 2019; Moghaddam et al., 2020; Do et al., 2021; Traversa et al., 2021) and Europe (Carli et al., 2012; Carli et al., 2014; Díaz-Regañón et al., 2017). In these localities, there are supposedly strains of *Cytauxzoon sp.* that are less virulent (Moghaddam et al., 2020), or even different isolates from those found in the USA (André et al., 2015). Indeed, three new species of *Cytauxzoon*, namely *C. banethi*, *C. otrantorum*, and *C. europaeus* have been recently described in wild felids from Europe (Panait et al., 2021).

However, the clinicopathological abnormalities of cats positive for *Babesia sp.* and *Cytauxzoon sp.* should be interpreted with caution, since coinfection of piroplasmids with other vector-borne pathogens (Anaplasmataceae agents, hemoplasmas, and *Bartonella*) seems to be more rule than exception (André et al., 2015; André et al., 2017).

The lack of Piroplasms detected in blood smears in this study as well as the high Ct values obtained in most samples are likely associated with a low parasitemia, which can be found in chronic cases of the diseases (Hartmann et al., 2013). In that regard, the majority of positive cats for *Cytauxzoon* sp in Brazil might act as chronic carriers (André et al., 2017), and they probably had presented a limited schizogonic phase (Legroux et al., 2017; Nentwig et al., 2018), which in turn would not be associated with clinical signs as observed in North American cats. Whole-genome, or at least mitochondrial sequencing is needed for a reliable comparison between Brazilian and American isolates (Uilenberg et al., 2018). Even so, our clinicopathological data strongly suggest *Cytauxzoon* sp. isolates from Brazil may not present the same pathogenicity as those from North America.

Recently, molecular markers have been employed not only as diagnostic tool, but also for studying the genetic diversity of Piroplasms (Hrazdilová et al., 2019; Panait et al., 2021). In the current research, the *cox1*-based haplotype network showed only one haplotype of *Babesia vogeli* in Brazil and the USA, but six in India. Indeed, the present work brings the first feline-associated *B. vogeli* *Cox-1* sequence deposited in GenBank database to date, precluding any additional inference on the genetic diversity of *B. vogeli* among cats around the world. Noteworthy, there are very few *Cox-1* sequences of dog-associated *B. vogeli*, despite the presence of numerous 18S rRNA sequences in Genbank, which in turn also preclude additional inferences on the genetic diversity of *B. vogeli* isolates from dogs and cats for comparative purposes. According to Andre et al. (2015), the infection of cats by *E. canis* and *B. vogeli* in Brazil might be associated with a spill-over phenomenon in areas endemic for canine monocytic ehrlichiosis and babesiosis. A limitation of the present study is that cloning of *cox-1* amplicons was not performed, which in turn could show the occurrence of more than one

Cox-1 haplotype in the same individual. Nonetheless, the scarcity of *B. vogeli Cox-1* sequences deposited in GenBank database might have underestimated the actual diversity of the Brazilian isolates, as we deposited the first sequences of *Cox-1* and Cytochrome B of feline *Babesia vogeli*. Even so, our findings suggest that even *Cox-1* marker presents a certain level of evolutionary conservation, it may bring more information than 18SrRNA when it comes to the genetic diversity of this *Babesia* species (Schreeg et al., 2016). Therefore, we encourage the use of mitochondrial genes for the study of Piroplasms diversity in dogs and cats isolates (Hrazdilová et al., 2019; Panait et al., 2021). Further new deposits of other Piroplasms could help obtain more information regarding *B. vogeli* and *Cytauxzoon felis in cats*. Indeed, the use of mitochondrial genes helped the description of three novel *Cytauxzoon* species in wild felids from Europe (Panait et al., 2021).

5. Conclusion

Based on our results, considering the absence of clinical, hematological and biochemical abnormalities observed in piroplasmid-positive cats, the tick-borne infections detected herein were not clinically relevant, albeit we have not verified the possibility of more severe diseases in immunosuppressed cats or in the presence of co-infections. This information set strengthens the hypothesis that our *Cytauxzoon* sp. isolates are different from the American ones. Furthermore, we found a high prevalence of those Piroplasms in Midwestern Brazil.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Federal Agency for the Support and Improvement of Higher Education (CAPES - Finance code 001) for the graduate scholarships granted to Camila Manoel de Oliveira, and the Federal District Research Support Foundation (FAPDF) for providing financial support. MRA received a fellowship of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - Productivity Grant Process #302420/2017-7).

Declarations of interest

The authors declare that they have no competing interests.

6. References

Alexandra, C., Mihalca, A.D., Brno, P.S., 2019. Molecular evidence of canine pathogens in tissues of European bats. *Int. Bat Res. Conf.* 50.

Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., Millán, J., 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and Vectors* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>

Altschul, S.F., ; Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nbt0388-282>

André, M.R., Adania, C.H., Machado, R.Z., Allegrettl, S.M., Fellppe, P.A.N., Silva, K.F., Nakaghi,

- A.C.H., Dagnone, A.S., 2009. Molecular detection of cytauxzoon spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. *J. Wildl. Dis.* 45, 234–237. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.234>
- André, M.R., Baccharim Denardi, N.C., Marques de Sousa, K.C., Gonçalves, L.R., Henrique, P.C., Grosse Rossi Ontivero, C.R., Lima Gonzalez, I.H., Cabral Nery, C.V., Fernandes Chagas, C.R., Monticelli, C., Alexandre de Santis, A.C.G., Machado, R.Z., 2014. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>
- André, M.R., Herrera, H.M., de Jesus Fernandes, S., de Sousa, K.C.M., Gonçalves, L.R., Domingos, I.H., de Macedo, G.C., Machado, R.Z., 2015. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>
- André, M.R., Filgueira, K.D., Calchi, A.C., de Sousa, K.C.M., Gonçalves, L.R., Medeiros, V.B., Ximenes, P.A., Lelis, V.C.N.G., de Meireles, M.V.N., Machado, R.Z., 2017. Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 525–531. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017064>
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>
- Birkenheuer, A.J., Breitschwerdt, E.B., Alleman, A.R., Pitulle, C., 2006a. Cytauxzoon felis

infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998–2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568–571. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1385>

Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006b. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 Cases (1998–2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568–571. <https://doi.org/10.2460/javma.228.4.568>

Birkenheuer, A.J., Marr, H., Alleman, A.R., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006c. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Vet. Parasitol.* 137, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.007>

Bosman, A.M., Oosthuizen, M.C., Venter, E.H., Steyl, J.C., Gous, T.A., Penzhorn, B.L., 2013. *Babesia lengau* associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats. *Parasites and Vectors* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-128>

Bosman, A.M., Penzhorn, B.L., Brayton, K.A., Schoeman, T., Oosthuizen, M.C., 2019. A novel *Babesia* sp. associated with clinical signs of babesiosis in domestic cats in South Africa. *Parasites and Vectors* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3395-x>

Brown, H.M., Lockhart, J.M., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2010. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. *Vet. Parasitol.* 172, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.041>

Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., Furlanello, T., Millotti, A., Caldin, M., Solano-Gallego, L., 2012. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Vet. Parasitol.* 183, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.025>

Carli, E., Trotta, M., Bianchi, E., Furlanello, T., Caldin, M., Pietrobelli, M., Solano-Gallego, L.,

2014. Cytauxzoon sp. infection in two free ranging young cats: clinicopathological findings, therapy and follow up. *Turkiye Parazitol. Derg.* 38, 185–189.

<https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3540>

Corduneanu, A., Ursache, T.D., Taulescu, M., Sevastre, B., Modrý, D., Mihalca, A.D., 2020.

Detection of DNA of *Babesia canis* in tissues of laboratory rodents following oral inoculation with infected ticks. *Parasit. Vectors* 13, 1–7.

<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04051-z>

de Sousa, K.C.M., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Freschi, C.R., Machado, R.Z., André, M.R.,

2018. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 245–253.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.010>

Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-Bueno,

L., García-Sancho, M., Agulla, B., Sainz, Á., 2017. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasites and*

Vectors 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2056-1>

Do, T., Kamyngkird, K., Chimnoi, W., Inpankaew, T., 2021. Evaluation of hematological

alteration of vector-borne pathogens in cats from Bangkok, Thailand. *BMC Vet. Res.* 17, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02737-1>

Eberhardt, J.M., Neal, K., Shackelford, T., Lappin, M.R., 2006. Prevalence of selected

infectious disease agents in cats from Arizona. *J. Feline Med. Surg.* 8, 164–168.

<https://doi.org/10.1016/j.jfms.2005.12.002>

- Furtado, M.M., Taniwaki, S.A., Metzger, B., dos Santos Paduan, K., O'Dwyer, H.L., de Almeida Jácomo, A.T., Porfírio, G.E.O., Silveira, L., Sollmann, R., Tôrres, N.M., Ferreira Neto, J.S., 2017. Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.005>
- Gadkar, V.J., Fillion, M., 2014. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr. Issues Mol* 16, 1–6.
- Hamel, D., Silaghi, C., Lescai, D., Pfister, K., 2012. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol. Res.* 110, 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2659-y>
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-jones, T., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2013. BABESIOSIS IN CATS ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 15, 643–646. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489230>
- Hornok, S., Estók, P., Kováts, D., Flaisz, B., Takács, N., Szoke, K., Krawczyk, A., Kontschán, J., Gyuranecz, M., Fedák, A., Farkas, R., Haarsma, A.J., Sprong, H., 2015. Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera. *Parasites and Vectors* 8, 8–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1052-6>
- Hornok, S., Szöke, K., Kováts, D., Estók, P., Görföl, T., Boldogh, S.A., Takács, N., Kontschán, J., Földvári, G., Barti, L., Corduneanu, A., Sándor, A.D., 2016. DNA of piroplasms of ruminants and dogs in ixodid bat ticks. *PLoS One* 11, 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167735>

Hrazdilová, K., Myśliwy, I., Hildebrand, J., Buńkowska-Gawlik, K., Janaczyk, B., Perec-

Matysiak, A., Modrý, D., 2019. Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Vet. Parasitol.* 266, 103–110.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.017>

Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrin, L., 2018. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>

Jefferies, R., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2007a. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet. Parasitol.* 144, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>

Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Broughton, D.K., Robertson, I.D., Irwin, P.J., 2007b.

Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust. Vet. J.* 85, 459–463. [https://doi.org/10.1111/j.1751-](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00220.x)

[0813.2007.00220.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00220.x)

Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals.*

Academic press.

Kidd, L., 2019. Optimal Vector-borne Disease Screening in Dogs Using Both Serology-based

and Polymerase Chain Reaction-based Diagnostic Panels. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 49, 703–718. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.011>

Lack, J.B., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., 2012. Phylogeny and evolution of the

Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 42, 353–363.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>

Legroux, J.P., Halos, L., René-Martellet, M., Servonnet, M., Pingret, J.L., Bourdoiseau, G., Baneth, G., Chabanne, L., 2017. First clinical case report of *Cytauxzoon* sp. infection in a domestic cat in France. *BMC Vet. Res.* 13, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1009-4>

Lloret, A., Addie, D.D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K., 2015. *Cytauxzoonosis* in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 17, 642–644. <https://doi.org/10.1177/1098612X15589879>

Maia, L.M.P., Cerqueira, A. de M.F., de Barros Macieira, D., de Souza, A.M., Moreira, N.S., da Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R.P., 2013. *Cytauxzoon felis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 289–291. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000200049>

Malheiros, J., Costa, M.M., do Amaral, R.B., de Sousa, K.C.M., André, M.R., Machado, R.Z., Vieira, M.I.B., 2016. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>

Malzoni, M., Akemi, S., Metzger, B., Paduan, S., Lucia, H., Dwyer, O., Tereza, A., Jácomo, D.A., Porfírio, G.E.O., Silveira, L., Sollmann, R., Mundim, N., 2017. Ticks and Tick-borne Diseases Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in

- Brazil ? Ticks Tick. Borne. Dis. 8, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.005>
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1993. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it.” *Eur. J. Protistol.* 29, 279–293. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80371-8](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80371-8)
- Meier, H.T., Moore, L.E., 2000. Feline Cytauxzoonosis: A Case Report and Literature Review Case Report, *J Am Anim Hosp Assoc.*
- Moghaddam, M.R., Zaeemi, M., Gholam, &, Razmi, R., 2020. Preliminary study of Cytauxzoon felis infection in outdoor cats in Mashhad, Iran. *Parasitol. Res.* 3, 4177–4183. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06780-7/Published>
- Nentwig, A., Meli, M.L., Schrack, J., Reichler, I.M., Riond, B., Gloor, C., Howard, J., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., 2018a. First report of Cytauxzoon sp. infection in domestic cats in Switzerland: Natural and transfusion-transmitted infections. *Parasites and Vectors* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2728-5>
- Nentwig, A., Meli, M.L., Schrack, J., Reichler, I.M., Riond, B., Gloor, C., Howard, J., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., 2018b. First report of Cytauxzoon sp. infection in domestic cats in Switzerland: natural and transfusion-transmitted infections. *Parasit. Vectors* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2728-5>
- Panait, L.C., Mihalca, A.D., Modrý, D., Juránková, J., Ionică, A.M., Deak, G., Gherman, C.M., Heddergott, M., Hodžić, A., Veronesi, F., Reichard, M., Ziemann, E.A., Nielsen, C.K., Jiménez-Ruiz, F.A., Hrazdilová, K., 2021. Three new species of Cytauxzoon in European wild felids. *Vet. Parasitol.* 290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109344>
- Pedrassani, D., Biolchi, J., Gonçalves, L.R., Mendes, N.S., Zanatto, D.C. de S., Calchi, A.C., Machado, R.Z., André, M.R., 2019. Molecular detection of vector-borne agents in cats in

Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28, 632–643. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019077>

Peixoto, P. V, Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.* 145, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.023>

Penzhorn, B.L., Oosthuizen, M.C., 2020. Babesia Species of Domestic Cats: Molecular Characterization Has Opened Pandora’s Box. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00134>

Persichetti, M.F., Solano-Gallego, L., Serrano, L., Altet, L., Reale, S., Masucci, M., Pennisi, M.G., 2016. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasites and Vectors* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1534-1>

Qurollo, B.A., Archer, N.R., Schreeg, M.E., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Haney, K.N., Thomas, B.S., Breitschwerdt, E.B., 2017. Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2064-1>

Ravagnan, S., Carli, E., Piseddu, E., Da Rold, G., Porcellato, E., Zanardello, C., Carminato, A., Vascellari, M., Capelli, G., 2017. Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. *Parasites and Vectors* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2069-9>

Sacristán, I., Sieg, M., Acuña, F., Aguilar, E., García, S., López, M.J., Cevidanes, A., Hidalgo-

- Hermoso, E., Cabello, J., Vahlenkamp, T.W., Millán, J., Poulin, E., Napolitano, C., 2019. Molecular and serological survey of carnivore pathogens in free-roaming domestic cats of rural communities in southern Chile. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 1740–1748.
<https://doi.org/10.1292/jvms.19-0208>
- Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J.L., Cohn, L.A., Bird, D.M., Scholl, E.H., Levy, M.G., Wiegmann, B.M., Birkenheuer, A.J., 2016. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS One* 11, 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>
- Sherrill, M.K., Cohn, L.A., 2015. Cytauxzoonosis: Diagnosis and treatment of an emerging disease. *J. Feline Med. Surg.* 17, 940–948. <https://doi.org/10.1177/1098612X15610681>
- Shock, B.C., Murphy, S.M., Patton, L.L., Shock, P.M., Olfenbuttel, C., Beringer, J., Prange, S., Grove, D.M., Peek, M., Butfiloski, J.W., Hughes, D.W., Lockhart, J.M., Bevins, S.N., VandeWoude, S., Crooks, K.R., Nettles, V.F., Brown, H.M., Peterson, D.S., Yabsley, M.J., 2011. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. *Vet. Parasitol.* 175, 325–330.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.009>
- Spada, E., Proverbio, D., Galluzzo, P., Perego, R., Bagnagatti De Giorgi, G., Roggero, N., Caracappa, S., 2014. Frequency of piroplasms *Babesia microti* and *Cytauxzoon felis* in stray cats from northern Italy. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2014/943754>
- Stephen F. Altschul; Warren Gish.; Webb Miller.; Eugene W. Myers.; and David J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *World J. Microbiol. Biotechnol.*

<https://doi.org/10.1038/nbt0388-282>

Traversa, D., Hodžic, A., Hafeez, M.A., Ravindran, R., Kumar, A.K., Malangmei, L., Gopalan Ajith Kumar, K., Nandini, A., Angeline Felicia Bora, C., Varghese, A., Mallappa Amrutha, B., Somalingappa Kurbet, P., Kariyappa Pradeep, R., Nimisha, M., Kalarickal Deepa, C., John, L., 2021. Molecular Characterization of Hemoparasites and Hemoplasmas Infecting Domestic Cats of Southern India. *Front. Vet. Sci* 7, 597598.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597598>

Uilenberg, G., 2006. Babesia-A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

Uilenberg, G., Gray, J., Kahl, O., 2018. Research on Piroplasmorida and other tick-borne agents: Are we going the right way? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 860–863.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.005>

Varshney, J., Deshmukh, V.V., Chaudhary, P.S., 2009. Fatal Cytauxzoonosis in a Kitten. *Intas Polivet* 10, 392–393.

Wang, J.L., Li, T.T., Liu, G.H., Zhu, X.Q., Yao, C., 2017. Two tales of cytauxzoon felis infections in domestic cats. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 861–885.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00010-17>

Weiss, D.J., Wardrop, K., 2011. *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons.

Wikander, Y.M., Anantatat, T., Kang, Q., Reif, K.E., 2020a. Prevalence of Cytauxzoon felis Infection-Carriers in Eastern Kansas Domestic Cats. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 9, 1–15.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9100854>

Wikander, Y.M., Kang, Q., Reif, K.E., 2020b. Acute Cytauxzoon felis Cases in Domestic Cats

from Eastern Kansas, a Retrospective Case-Control Study (2006-2019). *Vet. Sci.* 7, 205.

<https://doi.org/10.3390/vetsci7040205>

Yeagley, T.J., Reichard, M. V., Hempstead, J.E., Allen, K.E., Parsons, L.M., White, M.A., Little, S.E., Meinkoth, J.H., 2009. Detection of babesia gibsoni and the canine small babesia “Spanish isolate” in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235, 535–539.

<https://doi.org/10.2460/javma.235.5.535>

Zou, F.C., Li, Z., Yang, J.F., Chang, J.Y., Liu, G.H., Lv, Y., Zhu, X.Q., 2019. Cytauxzoon felis infection in domestic cats, Yunnan Province, China, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 353–

354. <https://doi.org/10.3201/eid2502.181182>

CAPÍTULO 3

Canine piroplasms: a clinical, laboratory and molecular characterization from Brazil

Abstract

Canine Piroplasmosis is a tick-borne disease that can be caused by *Babesia* spp., *Rangelia vitalii* and *Theileria* spp. In Brazil, while Canine Babesiosis is endemic, there are no reported cases of *Theileria* spp., and *Rangelia vitalii* has only been described in the South and Southeast of the country, to date. Studies analyzing the clinical, laboratory and molecular features of these hemoprotozoans are still scarce, and there are no data from Brasília, Midwestern Brazil. In the present study, a Complete Blood Count (CBC) and Biochemistry profile were performed for samples from 276 domestic dogs from Brasília, Federal District, Midwestern Brazil. A broader screening of mitochondrial quantitative PCR (qPCR) was used to detect piroplasm positive samples. The overall molecular prevalence obtained was 11.23% (31/276) of positive results, with 9.7% (27/276) of the sequences identified as *Babesia vogeli* with 98-100% identity with *Babesia vogeli* isolates from EUA. In addition, 1.44% (4/276) of the samples showed only 65.81% identity with our *Babesia vogeli* isolate. None of the analyzed dogs were positive for *Theileria* spp. or *Rangelia vitalii*. Subsequently, all positive sequences were run in three more Conventional PCR (cPCR) assays, resulting in a phylogenetic analysis and identification of the haplotype network. The Haplotype network showed six different haplotypes of *Babesia vogeli*, one shared with Brazilian, USA and Indian isolates. Piroplasm positive dogs had 2.3 times higher risk of having thrombocytopenia than the negative ones, as well as a tendency of anemia compared with non-infected dogs. The molecular results have demonstrated an apparently low intraspecific variability of

Babesia vogeli, and evidence of another undetermined *Piroplasm* sp. which possibly could infect domestic dogs from the region as an accidental parasite.

Keywords: Domestic dogs, *Babesia vogeli*, PCR, anemia, thrombocytopenia, Haplotype Network

1. Introduction

Piroplasmids are among the most important agents of tick-borne diseases of domestic and wild animals worldwide. Canine piroplasmosis belongs to Phylum Apicomplexa, Order Piroplasmorida, which comprises the genus *Babesia* spp., *Theileria* spp. and *Rangelia vitalii* (Uilenberg, 2006; Lack et al., 2012; Alvarado-Rybak et al., 2016).

Originally, *Babesia* infected dogs were classified in two groups according to their size: large *Babesia* - *Babesia canis* (3.0-5.0 μm) or small *Babesia* – *Babesia gibsoni* (0.5-2.5 μm) (Boozer and Macintire, 2003; Köster et al., 2015). Due to the development of molecular methods and based on phylogenetic analyses, it was demonstrated that there were other species with similar morphological features, but which were different genetically. At present, *Babesia canis*, *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*, previously considered as subspecies, are distinct species (Zahler et al., 1998; Carret et al., 1999). Regarding small piroplasms, they are currently classified in *Babesia gibsoni*, *Babesia conradae* (Kjemtrup et al., 2006; Solano-Gallego and Baneth, 2011) and *Babesia vulpes* (Baneth et al., 2015; Baneth et al., 2019). Recently, a new *Babesia* sp., found in Israel and named *Babesia negevi*, has shown intermediate size compared to other *Babesia* spp. (Baneth et al., 2020). In Brazil, only *Babesia gibsoni* (Trapp et al., 2006b), *Babesia vogeli* (Passos et al., 2005), and a genotype closely related to *Babesia caballi* (de Sousa et al., 2018) have been reported in dogs, to date.

Rangelia vitalii is a protozoan that causes Rangeliosis, a re-emerging disease,

as its etiological agent was found to be valid only in 2011 (Soares et al., 2011), despite first being reported in 1908 (Carini, 1908). This may be because both *Babesia* sp. and *Rangelia vitalii* may have similar clinical and laboratory signs such as anemia, fever, anorexia, jaundice, thrombocytopenia, lethargy, splenomegaly and hepatopathy (Boozer and Macintire, 2003; De Valgas E Bastos et al., 2004; Paim et al., 2011; Soares et al., 2011; Lemos et al., 2017). Distinction between both was formerly based only on the research of the causative agent in blood smears, leading to misdiagnosis. Therefore, for a long time, *Babesia* sp. diagnosis may have been made instead of *Rangelia vitalii* (Lopes et al., 2014).

Although *Babesia vogeli* has already been widely reported in dogs in Brazil (Passos et al., 2005; Costa-Júnior et al., 2009; O'Dwyer et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Ramos et al., 2010; Spolidorio et al., 2011; Costa-Júnior et al., 2012; Lemos et al., 2012; Silva et al., 2012; Sousa et al., 2013; Moraes et al., 2014; Rotondano et al., 2015; Moraes et al., 2015; Ribeiro et al., 2017; de Sousa et al., 2018; Vieira et al., 2018; Paulino et al., 2018; Castro et al., 2020; Barbosa et al., 2020), cases of Rangeliosis remain restricted to the South and the Southeast of the country (Figuera et al., 2010; Soares et al., 2011; Lemos et al., 2012; Malheiros et al., 2016; Gottlieb et al., 2016; Mongruel et al., 2017; Lemos et al., 2017; Silva; et al., 2019; Fournier et al., 2020). Nevertheless, there are no epidemiological studies investigating its etiological agent in other regions, such as the Midwest, despite its reservoir *Cerdocyon thous*, a crab-eating fox, being found in that region (Nascimento et al., 2013). Moreover, a new case of molecular detection of *Rangelia vitalii* DNA in a nymph of *Amblyomma sculptum* (tick not recognized as a vector of the disease)(Soares et al., 2018) was reported in Brazil (Campos et al., 2018). Rangeliosis was recently described in a dog in San Roque, Paraguay, a city where its natural vector, *Amblyomma aureolatum*, was not found

(Inácio et al., 2019). This leads to the question of whether another tick may play some role in acting as a possible vector, or, possibly in these cases, the transmitter tick was not found until that moment. Therefore, in places where there is no report of this natural vector should be left verified (Irwin, 2014) .

Despite an increase of *Theileria* spp. cases being described in Europe (Criado-Fornelio et al., 2003; Criado et al., 2006; Beck et al., 2009; Fritz, 2010), Asia (Qablan et al., 2012; Bigdeli et al., 2012; Aktas et al., 2015; Xu et al., 2015; Díaz-Regañón et al., 2020; Habibi et al., 2020; Sili et al., 2021), Africa (Matjila et al., 2008a; Matjila et al., 2008b; Kamani et al., 2013; Adamu et al., 2014; Rosa et al., 2014; Rjeibi et al., 2016; Sili et al., 2021), there is only one recent report described in South America. This case occurred in Paraguay, and it was detected only in one asymptomatic domestic dog. The sequence was identified as *Theileria equi*, closely positioned to *T. equi* in horses and *Theileria* sp. in a domestic cat, both from Brazil (Inácio et al., 2019), which raises the question of the real prevalence of these piroplasms in other places in South America.

To investigate the real occurrence of Piroplasmids in dogs from Brasilia, Federal District, a place where there are no published data about *Babesia* species, *Rangelia vitalii* or *Theileria* spp. in domestic dogs, we evaluated the presence of these hemoprotazoans through the use of hematological, biochemical and molecular analysis in dogs from Federal District, Brazil.

2. Material and Methods

2.1 Animals and sampling sites

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Brasilia, under protocol number 40/2017 - UnB DOC. Between January/2017 and December/2019, 276 domestic dogs (*Canis familiaris*) were selected by convenience in

Brasilia (15° 47' 38" S 47° 52' 58" O). These animals were sampled in private clinics, shelters, and kennels of the Federal District (FD) or from the Veterinary Hospital of the University of Brasilia, regardless of age, sex, breed, and health status.

2.2 Hematological and biochemical analysis

Blood samples were collected from all dogs from the cephalic or jugular veins into ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA)-coated tubes for complete blood count (CBC) and DNA extraction, and into tubes containing a clotting activator for biochemical analysis. All the hematological and biochemical analyses were run at the Veterinary Clinical Pathology Laboratory from the College of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, FD. The CBC and haemoglobin concentration was obtained using an automatic cell counter (ABC Vet Horiba® ABX diagnostics, Brazil). The Packed Cell Volume (PCV) was determined by microhematocrit centrifugation. Differential leukocyte counts were obtained by direct observation of 100 leukocytes in Diff-quick stained blood smears using a light microscope (CX40RF200, Olympus, Japan). All blood smears were checked for the presence of platelet aggregate and hemoparasite inclusions. Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated. Plasma protein concentration was determined by refractometry (models SZJ-D and RTP-20 ATC). Serum samples were analyzed for concentrations of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total serum protein, albumin, urea and creatinine, in an automatic biochemistry analyzer (Cobas c111 Roche®). The reference intervals for CBC and biochemical analysis were according to Weiss and & Wardrop, 2011, and Kaneko et al., 2008, respectively. Hematological abnormalities were considered as anemia (PCV < 37%, and/or Red blood cells < $5.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ and/or Hemoglobin < 12.5g/dL), leukopenia (White Blood Cells < $6,000 \times 10^3/\mu\text{L}$) or thrombocytopenia (Platelets < $200.000 \times 10^3/\mu\text{L}$).

2.3 Molecular analysis

2.3.1 DNA extraction

DNA was extracted from total blood (EDTA tube) using the commercial kit Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (Promega Corporation®, WI, EUA), according to the manufacturer's recommendations. DNA was stored at -20°C until PCR analysis. The DNA sample concentration and quality were evaluated by optical spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific®).

A housekeeping PCR targeting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was performed to confirm the presence of canid genomic DNA and the absence of PCR inhibitors in all DNA samples (Birkenheuer et al., 2003).

2.3.2 PCR assays

All samples were screened for the presence of piroplasmid DNA using a broad-range qPCR assay targeting a 108-173bp region from the mitochondrial large subunit (mtLSU4) DNA as previously described (Qurollo et al., 2017). All qPCR assays were performed at the Vector-Borne Disease Diagnostic Laboratory (College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA). The qPCR was carried out using the primers BAB-LSU4 F (ACCTGTCAARTTCCTTCACTAAMTT), BMIC-LSU4 F (TTGCGATAGTAATAGATTTACTGC) and BAB-LSU4 R (TCTTAACCCAACTCACGTACCA).

Briefly, the amplification reaction was performed using the Thermocycler Biorad CFX96 Real-Time System C1000 Touch. The qPCR assays contained 12.5 µl of SSO Advanced SYBR Universal Supermix 2X (BioRad, Hercules, USA), 5µL DNA template, 0.3 µL of BAB primers (0.6 µM), 0.2 µL of BMIC primer (0.4 µM) and molecular grade water to a final volume of 25 µL. The amplification protocol used was as follows: 3 min at 98°C, followed by 40 cycles of 15 s at 98°C, 15 s at 60°C, and 15 s at 72°C. The melting curve

was acquired using 0.5 °C steps, withholds of 2 s, from 65 to 95 °C. The results were assessed through observation of amplification curves. In all qPCR assays, a *B. microti-like* plasmid and *B. odocoilei* plasmid were used as positive controls, and a negative dog DNA plus no template control (NTC) - Ultrapure water - were used as negative controls. All amplicons were submitted to an electrophoresis gel on 2% agarose gel stained with *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc, USA), regardless of being positive or negative on qPCR. Those samples with poor Identity using the LSU4 qPCR were submitted to another type of qPCR, the Apicomplexa-specific (18S rRNA gene target) (Tyrrell et al., 2019).

Subsequently, all positive samples were analyzed at the Veterinary Molecular Biology Laboratory from the College of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, FD. These samples were subjected to further molecular characterization using conventional PCR (cPCR) assays targeting three molecular markers (**Table 1**), and co-infections were screened for *Leishmania* spp: ~603 bp (Schönian et al., 2003) and *Ehrlichia canis*: ~396 bp (Murphy et al., 1998). The cPCR reactions described herein were adapted from the original sources for reaction set-up and cycling. Amplifications of all rounds were performed in a total volume of 25 µL containing 1 µL of template DNA, except for the amplification of CytB sequences that were carried out using 2 µL of DNA for the first round, and for the amplification of the *Leishmania* spp sequences, which were carried out using 2.5 µL of DNA. Amplified DNA was electrophoresed and visualized using and UV illumination on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. For all cPCR, DNA positive controls were obtained from naturally infected dogs (MZ648124), and, for negative controls, MilliQ® Ultra-pure water (Sigma-Aldrich Inc, Germany) was used. All samples were run in duplicate.

Table 1. Molecular markers used in this study and their molecular characteristics

Targeting gene	Targeting agent	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Ta (°C)	Length (bp)	Reference
18S rRNA (cPCR)	Piroplasms	BT-F1	F-GGCTCATTACAACAGTTATAG	58	~830	(Jefferies et al., 2007)
		BT-R1	R-CCCAAAGACTTTGATTCTCTC'			
		BT-F2	F-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC	62	~790	
		BT-R2	R-GGACTACGACGGTATCTGATCG			
Cox-1 (mitochondrial marker)	<i>Babesia</i> spp.	Bab-For1	F-ATWGGATTYATATGAGTAT	45	~1250	(Hrazdilová et al., 2019)
		Bab-Rev1	R-ATAATCWGGWATYCTCCTTGG			
		Bab-For2	F-TCTCTWCATGGWTTAATTATGATAT	49	~980	
		Bab-Rev2	R-TAGCTCCAATTGAHARWACAAAGTG			
CytB (mitochondrial marker)	<i>Babesia</i> spp.	Bc-CytB-F1	F-TGGTCWTGGTATTCWGGAATG	50	~700	(Hrazdilová et al., 2019)
		Bc-CytB-R1	R-AAGMYARTCTYCCTAAACATCC			
		Bc-CytB-F2	F-RATKAGYTAYTGGGGAGC	48	~580	
		Bc-CytB-R2	R-GCTGGWATCATWGGTATAC			

2.3.3 Amplicon purification, sequencing and BLAST analysis

Amplicons from all qPCR positive samples were submitted for bidirectional Sanger sequencing to confirm the results (GENEWIZ, Inc., Raleigh, NC, USA). Regarding the cPCR assays, the amplicons were previously purified using the Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up purification kit (Machereyl-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the purified amplicons were sequenced at the Center of Biological Resources and Genomic Biology (CREBIO), Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Geneious Prime (v. 9.0.5.) was used to align and analyze DNA results with reference sequences from GenBank. The primers regions were submitted to manual trimming. Identity, query coverage, and e-values were assessed by the BLASTn tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) - using default parameters, available in the NCBI GenBank database (Altschul et al., 1990).

2.3.4. Phylogenetic analysis

All sequences in this study were submitted to BLASTn tool and seventy-five 18S rRNA piroplasmid sequences were retrieved from GenBank database for the phylogenetic analysis. Nucleotide alignment with partial sequences (234 bp) obtained in both 18S cPCR and qPCR was performed using the ClustalW algorithm. General Time-Reversible (GTR) substitution model with gamma distribution (+G) was applied in accordance with the jModelTest v2.1.10 tool. The tree was constructed by Maximum-likelihood method in RAxML v8.2 (Stamatakis, 2014), and bootstrap was carried out with 1,000 replicates. *Neospora caninum* was chosen as an outgroup.

2.3.5. Haplotype network

TCS Network was performed in PopART v.1.7 software using all available sequences of *Cox-1* from *Babesia vogeli* deposited in GenBank, and the sequences

obtained in the present study. DnaSP v.6 was applied to calculate nucleotide diversity (π), number of haplotypes (h), diversity of haplotype (Dh), average number of nucleotide differences (K) and number of segregating sites (S).

2.4. Statistical analysis

The effects of the result of the test for agents (positive or negative), sex, age or origin on blood parameters were evaluated in a General Linear Model (PROC GLM) and means compared using Duncan's Multiple range Test, with $P < 0.05$ used as a significant difference. The effect of sex, age and origin of the animal on the test outcome (0 = negative; 1 = positive) were evaluated using logistic regression (PROC LOGISTIC). The logistic regression model with the odds ratio value was calculated for the cases which had an association with the positive results to test the independent risk factors for the infection. A chi-square test of frequencies was used to see the effect of the test result on sex, age, origin anemia, leukopenia and thrombocytopenia (PROC FREQ). All data were analyzed in SAS (Statistical Analysis System Institute, Cary, North Carolina).

3. Results

3.1 Epidemiological and clinical findings

Overall molecular prevalence using the qPCR LSU4 was 11.23% (31/276) of positive results, but only 9.7% (27/276) could be identified as *Babesia* sp, since 1.44% (4/276) of the samples did not match any sequence in GenBank database.

Even though the data on gender, age and origin were not statistically significant between the infected and uninfected dogs, female dogs had the highest prevalence for both groups, with 19/31 (61.29%) and 137/245 (55.92%), respectively. The most frequent age range for the positive dogs was from 2 to 7 years, with a 9/27 (33.33%) frequency. Most positive dogs 19/31 (61.29%) originated from the urban area,

but the same origin was also observed for the negative dogs 119/245 (48.57%). (**Table 2**). In addition, almost 50% (15/31) of the infected dogs were asymptomatic at the time of diagnosis by PCR. (**Supplementary material 1**)

3.2 Hematological and biochemistry profile

From all 276 samples, only three animals (3/276, 1.08%) had intracytoplasmatic inclusions detected on blood smear by optical microscopy. Two samples had Babesia-like merozoites, and one had *Hepatozoon* sp gametocytes. No other hemoparasites, such as *Ehrlichia* sp. morulae, were found on the other samples, even those with a positive PCR result for the same agent. No significant abnormalities were identified for almost all hematological parameters. However, the mean Hemoglobin concentration showed a significant difference between the piroplasms positive and negative animals. Piroplasms positive dogs had a lower Hemoglobin mean (12.5; $R^2=0.109497$; $CV=23.62$; $p<0.05$) compared to the negative ones (14.58), although those values are not indicative of anemia. Lower values were found for Red blood cells (5.7; $R^2=0.075$; $CV=23.12$) and PCV (39.5; $R^2=0.093$; $CV=21.77$) for the positive dogs, compared to the negative animals, although these were not significant. Regarding the biochemical parameters, none of the values were out of the normal range (**Table 3**).

The Table 4 shows that the analysis of the presence of anemia, leukopenia and thrombocytopenia for both groups showed a significant difference in platelet number ($p=0.03$). Animals with thrombocytopenia were 38.71% (12/31) in the positive group, whereas the negative dogs had only 21.28% (50/235). A statistical trend was observed for anemia between both groups ($p=0.06$). While the frequency was 45.16% (14/31) for the positive group, the negative dogs showed a frequency of 28.81% (68/236). No significant difference was identified for leukopenia evaluation, and dogs

without this alteration had the highest frequency, for both positive (90.32%; 28/31) and negative dogs (88.14%; 208/236) **Table 4**.

The risk factor analysis showed that Piroplasm positive animals were 2.3 times or 133% (95% CI: 1.06 – 5.14) at a higher risk of having thrombocytopenia than the negative dogs. Nevertheless, most dogs had no thrombocytopenia in both groups. Likewise, positive animals had two times (95% CI: 0.9502 – 4.3566) greater statistical trend of having anemia than the negative ones, although the majority of the dogs from all groups had no anemia. The absence of leukopenia was seen in most positive and negative dogs.

3.3 Sequencing analysis

The results regarding the evaluation of DNA sample concentration by optical spectrophotometry were between 11 ng/ μ L and 146 ng/ μ L, with most samples with values more than 20ng/ μ L. The 260/280 ratio of all samples was near 1.8.

The consensus sequences for all sequences, except those four with poor identity, had about 140 bp length, with 98-100% Identity to *Babesia vogeli* isolate from EUA (KC207825.1), with 100% cover in BLASTn search. The CT value ranged from 20.25 to ~40, and all samples were positive on the gel. We obtained from the 18S rRNA qPCR amplification of the four piroplasmid samples, three sequences (MZ595100), (MZ595101), (MZ595102) ranged between 215-257 bp in length and shared 100% nucleotide identity among them (**Figure 1**). One of the Piroplasmida sp. (MZ595100) showed, with 100% cover, 88.12%, 88.03%, 87.31% and 87.26% nucleotide identity with *Theileria bicornis* isolate (MN595051.1), *Babesia vesperuginis* isolate SD030 (MG832415.1), *Babesia* sp. strain EEZA-CRETAV (MW287597.1) and *Theileria* sp. isolate

B60 (MG251439.1), respectively. Regarding co-infection screening, only two animals were positive for *Leishmania* sp. on cPCR, whereas *Ehrlichia canis* was identified in four out of all samples analyzed. None of the analyzed dogs were positive for *Theileria* spp. or *Rangelia vitalii* by PCR analysis.

Concerning the molecular marker 18S rRNA cPCR, the length of the seven sequences of *Babesia vogeli* identified in this study (MZ594998; MZ599499; MZ595000; MZ595001; MZ595002; MZ595003; MZ595004) ranged between 649-751 bp. They showed 100% nucleotide identity among them and, in BLASTn, 98-100% to other isolates (e.g., AY371194.1, AY371195.1, AY37119.1, MN067709.1, MG041384.1), with 100% coverage. Phylogenetically all isolates were grouped in a monophyletic and polytomic clade with other *Babesia vogeli* sequences (AY072925.1 – Italy and AY371194.1- Brazil), that is supported by a high bootstrap. Monophyly of well-characterized piroplasmid groups (e.g.: *Babesia* sensu stricto) were maintained in the present tree, except for the Western group. Based on the branch lengths (**Figure 2**), these three sequences obtained from the 18S rRNA qPCR seem to be phylogenetically closer to the *Babesia* isolates of the Percei group. However, the clade that joins them is not well supported, and the length of the sequences are short, so it is not possible to assign them to a specific piroplasmid genus.

Seven sequences were amplified for *Cox-1*, while Cytochrome B PCR reactions produced ten sequences (**Table 5**). In BLASTn search, closest GenBank entries for the *Cox-1* sequences included an American isolate (KC207825.1 – EUA) and an Indian isolate (MN176018.1) with 100% nucleotide identity and 100% cover. Cytochrome B sequences had the best hit with MK888706.1, MK888703.1, isolates from China, and KC207825.1, from the United States, with 100% nucleotide identity and 100% cover.

The pairwise identity based on 18S rRNA partial sequence among the piroplasmid isolates from this study, compared with the GenBank isolates, that were provided by their multiple sequence alignment (MSA), is shown in 18S Identity Matrix A (**Supplementary Material 2**). Our seven *Babesia vogeli* sequences (MZ594998; MZ599499; MZ595000; MZ595001; MZ595002; MZ595003; MZ595004) showed 100% Identity among them and with the isolates from Italy (AY072925.1) and Brazil (AY371194.1) in the MSA. On the other hand, the Piroplasmida sp. sequences had only 65.81% identity with our *Babesia vogeli* isolates. Comparing these sequences with the GenBank isolates, the highest Identities found were 83.76, 82.47% and 82.05%, related to *Babesia* sp. EEZA-CRETAV (MW287597.1), *Babesia peircei* AP174-09/Rambo (MF288025.1) and *Babesia ardeae* (KY436057.1), respectively. All these *Babesia* species belong to the Percei clade.

The Haplotype network showed only one haplotype (H1) of *Babesia vogeli* in Brazil, which was also shared with the isolate from the EUA and India. Conversely, India has been shown to have six different haplotypes in total. Nucleotide diversity (π) was calculated as 0.00310; number of haplotypes (h) - 6; diversity of haplotypes (Dh) - 0.516; segregating sites (S) - 9; average number of nucleotide differences (K) - 1.247 (**Figure 3; Table 6**).

Supplementary material 1 – Clinical, laboratory and molecular data on qPCR positive dogs

Sample	Sequencing result	Symptoms?	Age	Sex	Breed	Origin	Co-infections	Hematology	Biochemistry
1	Not identified protozoan	Asymptomatic	4 months	Female	Irish Setter	Kennel	No	M, ↓TPP	*
2	Not identified protozoan	Asymptomatic	Adult	Male	Mixed breed	Shelter	No	M, ↓Ht, ↓RBC	↑ALP
3	Not identified protozoan	Asymptomatic	Adult	Female	Mixed Breed	Shelter	No	*	*
4	Not identified protozoan	Asymptomatic	1 year	Male	French Bulldog	Urban area	No	↓platelets	*
5	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	5 months	Female	Irish Setter	Kennel	No	↓RBC, ↓TPP	↓TP
6	<i>Babesia vogeli</i>	Apathy, inappetence	8 months	Male	German Shepherd	Rural area	No	↓RBC, Ht, Hb, ↓lymp, ↓TPP, ↑MCV, ↓MCHC	↑ALP
7	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	Adult	Female	Mixed breed	Rural area	No	↓WBC, ↓seg. neut, ↓MCV	*
8	<i>Babesia vogeli</i>	Apathy, lethargy	4 years	Male	Poodle	Urban area	<i>Ehrlichia canis</i>	↓platelets, ↓seg. neut	*
9	<i>Babesia vogeli</i>	Apathy, inappetence	9 years	Male	Pit Bull	Urban area	No	Pancytopenia, ↑MCV, ↓MCHC, ↓seg. neut	*
10	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	Adult	Female	Mixed Breed	Shelter	No	↓WBC, ↓seg. Neut, ↓platelets	*
11	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	10 years	Male	Mixed Breed	Shelter	No	*	↑ALT
12	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	8 years	Female	Mixed Breed	Urban area	No	Pancytopenia	↓TPP, ↓Alb
13	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	7 months	Female	Mixed Breed	Urban area	No	L; E	↓TPP, ↓Alb
14	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	-	-	-	Urban area	No	↓lymp	*
15a	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	Adult	Female	Mixed Breed	Urban area	No	Anemia, ↓platelets, L, ↑lymp	↑TPP, ↓Alb
16	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	-	Female	Mixed Breed	Urban area	No	↓platelets	*
17b	<i>Babesia vogeli</i>	-	3 years	Female	Mixed Breed	Urban area	<i>Ehrlichia canis</i>	Anemia, ↓platelets	↑TPP, ↓Alb
18	<i>Babesia vogeli</i>	-	2 years	Female	Yorkshire	Urban area	No	*	*
19	<i>Babesia vogeli</i>	Inappetence	2 years	Male	Labrador	Urban area	<i>Ehrlichia canis</i>	↓platelets	↑ALT
20	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	-	Female	Mixed Breed	Urban area	No	↓platelets	*
21	<i>Babesia vogeli</i>	Dermatitis	-	Female	-	Urban area	No	Anemia, L, M, E, ↑TPP	↑TPP, ↓Alb
22	<i>Babesia vogeli</i>	-	2 months	Male	Pit Bull	Urban area	<i>Ehrlichia canis</i>	Anemia, L, ↑seg. Neut and bands ↑MCV, ↓MCHC	↑ALP
23	<i>Babesia vogeli</i>	-	5 years	Male	-	Urban area	<i>Leishmania</i> sp	Anemia, L, ↑seg. Neut and bands, ↓platelets, ↓lymp	↓Alb
24c	<i>Babesia vogeli</i>	-	10 years	Female	Yorkshire	Urban area	<i>Leishmania</i> sp	Anemia, ↑MCV, ↓platelets	↑ALT, ↑ALP
25	<i>Babesia vogeli</i>	Cough, alopecia	2 years	Female	Mixed Breed	Shelter	No	*	↓TPP
26	<i>Babesia vogeli</i>	Asymptomatic	4 years	Female	Teckel long hair	Kennel	No	↑platelets	*
27	<i>Babesia vogeli</i>	dermatopathy	2 years	Female	Pinscher	Urban area	No	*	*
28	<i>Babesia vogeli</i>	Jaundice	2 years	Male	-	Urban area	No	Anemia, ↓platelets	↑AP, ↑U
29	<i>Babesia vogeli</i>	-	13 years	Male	Dobermann	Rural area	No	*	↑ALT
30	<i>Babesia vogeli</i>	Pneumonia, Inappetence	8 years	Male	Dachshund	Urban area	No	L, E	↑ALT, ↑TPP
31	<i>Babesia vogeli</i>	Mammary tumor	12 years	Female	Cocker Spaniel	Urban area	No	↓lymp	↑ALP

Legend:

- : missing data

N: Neutrophilia; M: Monocytosis; RBC: Red Blood Cell; Ht: Hematocrit; Hb: Hemoglobin; MCH: Mean Corpuscular Volume; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Volume; WBC: White Blood Cell; Seg. Neut: Segmented neutrophil; Alb: Albumin; L: Leukocytosis; E: Eosinophilia; lymp: lymphocytes; bands: band neutrophils

TPP: Total Plasmatic Protein; ALP: Alkaline Phosphatase; TP: Total Protein; ALT: Alanine transaminase; U: urea

a *Hepatozoon* sp on blood smear/ b *Hepatozoon* sp and piroplasm on blood smear/c: piroplasm on blood smear

*Within the normal range

Table 2 - Frequency data on Piroplasms LSU4 qPCR negative and positive dogs

Variable/total	Negative dogs n (%)	Positive dogs n (%)
Sex (n=276)	245 (88.77)	31 (11.23)
Female(F)	137 (55.92)	19 (61.29)
Male(M)	108 (44.08)	12 (38.71)
Age-years (n=242)	215 (88.84)	27 (11.16)
0-1	48 (22.33)	6 (22.22)
>1-2	25 (11.63)	5 (18.52)
>2-7	90 (41.86)	9 (33.33)
>7	52 (88.14)	7 (25.93)
Origin (n=276)	245 (88.77)	31 (11.23)
Kennel	64 (26.12)	6 (19.35)
Shelter	31 (12.65)	5 (16.13)
Urban area	119 (48.57)	19 (61.29)
Rural area	31 (12.65)	1 (3.23)

Table 3 - Mean values of the hematologic and biochemistry data on Piroplasms LSU4 qPCR negative and positive dogs

Variable	Negative dogs	Positive dogs	R ²	CV
Hematologic features				
Red blood cells (x10 ⁶ /μL)	6.2	5.7	0.074850	23.12
Hemoglobin (g/dL)	14.58*	12.5*	0.109497	23.62
PCV (%)	42.92	39.5	0.092764	21.77
Total Plasmatic Protein (g/dL)	7.0	6.7	0.151824	16.35
MCV (fL)	71.2	68.8	0.016538	11.80
MCHC (%)	34.0	32.7	0.090990	11.12
White blood cells (x10 ³ /μL)	10.732	10.477	0.054971	48.89
Band neutrophils (%)	9.26	0.52	0.199632	400.08
Band neutrophils (/μL)	610*	56*	0.282335	264.10
Segmented neutrophils (%)	63.88	60.90	0.113138	20.68
Segmented neutrophils (/μL)	6.983	6.463	0.055414	60.19
Lymphocytes (%)	21.70	21.12	0.051409	53.97
Lymphocytes (/μL)	2.130	2.122	0.038668	76.06
Monocytes (%)	6.40	6.31	0.073128	72.90
Monocytes (/μL)	661	658	0.044521	104.48
Eosinophils (%)	7.93	7.92	0.193759	74.37
Eosinophils (/μL)	826	767	0.142760	92.76
Platelets (x10 ³ /μL)	282.815	236.480	0.143688	46.10
Biochemistry				
ALT (UI/L)	54.15	79.36	0.196794	103.4119
Alkaline phosphatase (UI/L)	122.87	142.25	0.099818	193.0705
Creatinine (mg/dL)	0.8	0.94	0.064217	78.58
Urea (mg/dL)	39.6	40.9	0.058067	76.81
Total protein (g/dL)	6.5	6.6	0.122172	17.07
Albumin (g/dL)	3.2	3.3	0.050197	22.15

R² - coefficient of determination; CV - coefficient of variation *Statistically significant differences (P < 0.05)

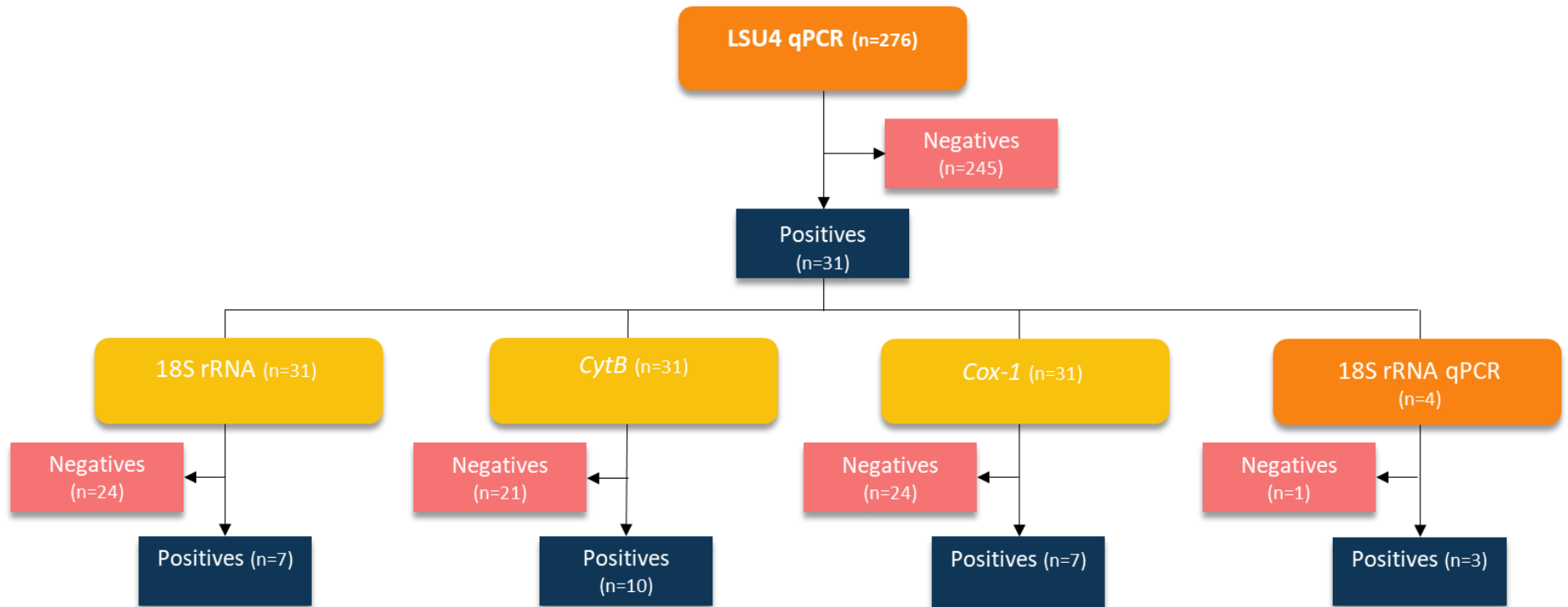
PCV: Packed Cell Volume; MCV: Mean Corpuscular Volume; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Volume

Table 4 - Frequency data on Piroplasms LSU4 qPCR negative and positive dogs versus hematological abnormalities

PCR result/Variable n (%)	Anemia**		Leukopenia		Thrombocytopenia*	
	No	Yes	No	Yes	No	Yes
Negative dogs	168 (71.19)	68 (28.81)	208 (88.14)	28 (11.86)	185 (78.72)	50 (21.28)
Positive dogs	17 (54.84)	14 (45.16)	28 (90.32)	3 (9.68)	19 (61.29)	12 (38.71)
Total	185 (69.29)	82 (30.71)	236 (88.39)	31 (11.61)	204 (76.69)	62 (23.31)

*Statistically significant differences (P=0.0309); ** statistical trend (P=0.0636)

Figure 1 – Molecular results of the molecular markers used in this study



Notes: Boxes in orange: Quantitative PCR (qPCR) performed; Boxes in yellow: Conventional PCR (cPCR) performed. 18S rRNA qPCR was performed only for those samples which did not match any sequence on GenBank.

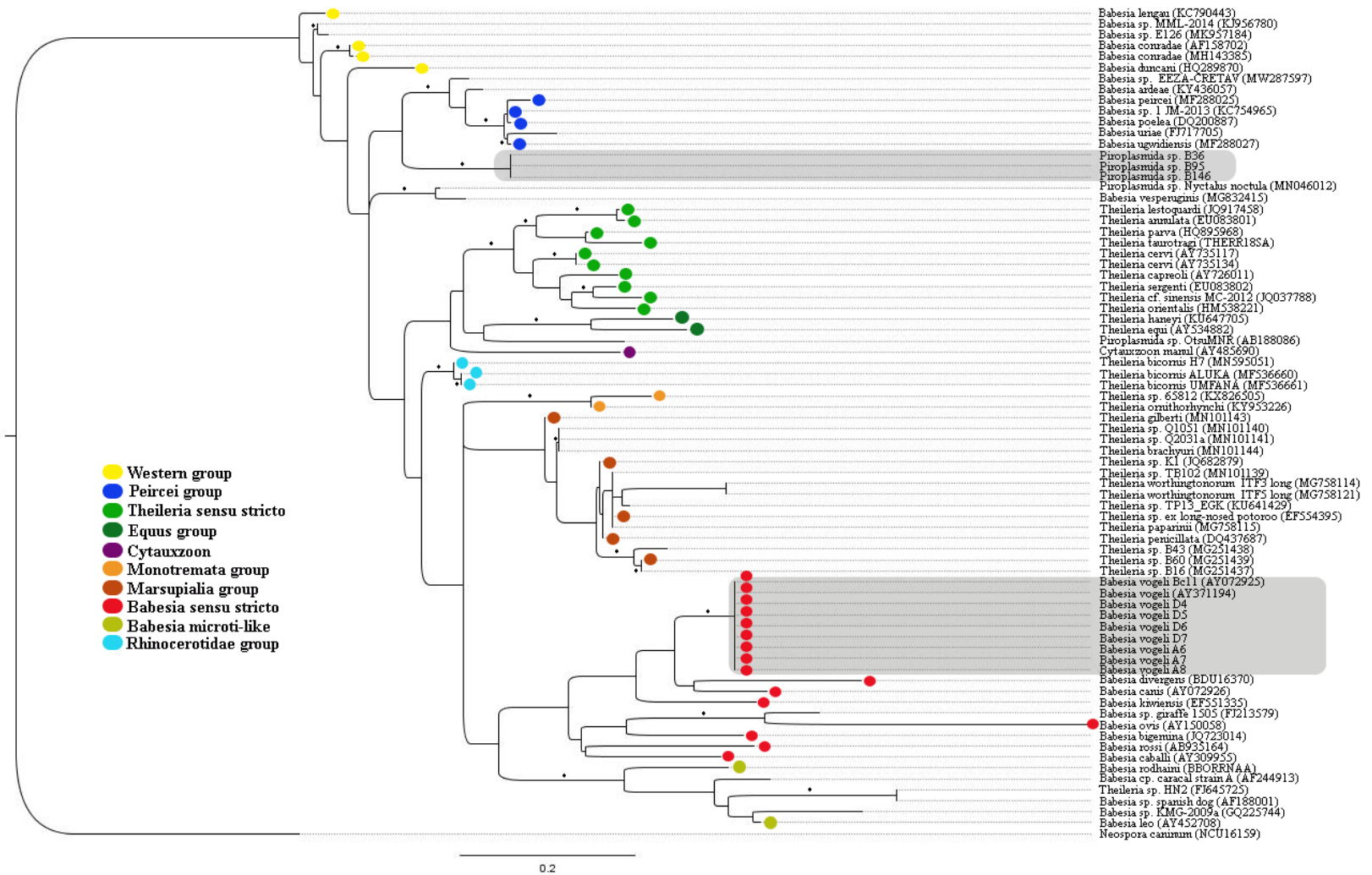


Figure 2. Maximum-likelihood tree based on partial 18S ribosomal nucleotide sequence (234 bp) of 76 piroplasmid sequences. The tree is outgroup rooted with *Neospora caninum* and was built in RAxML v8.2 software using general time reversible (GTR) substitution model with gamma distribution (+G) in accordance to jModelTest v2.1.10 analysis. Bootstrap was performed with 1000 replicates and values equal to 75 or more are represented by asterisks. Clade groups of the sequences identified in this study are labelled in grey. Prototype isolates are identified by colors in accordance with the classification system showed by Jalovecka et al. (2019). GenBank accession numbers are shown in parentheses.

Table 5 – Molecular characterization of the three molecular markers used in this study.

Animal ID	GenBank accession number	Target gene	Sequence Length (bp)	Identity (%)	Query Cover (%)	Closest GenBank entry
A	MZ594998	18S rRNA	751	100%	100%	MN067709.1 - China
B	MZ594999	18S rRNA	749	99.87%	100%	MN067709.1 - China
C	MZ595000	18S rRNA	723	100%	100%	AY371194.1 - Brazil
D	MZ595001	18S rRNA	695	100%	100%	AY371195.1 - Brazil
E	MZ595002	18S rRNA	724	100%	100%	MN067709.1 - China
F	MZ595003	18S rRNA	688	100%	100%	AY371195.1 - Brazil
G	MZ595004	18S rRNA	649	100%	100%	AY371195.1 - Brazil
B	MZ577088	COX-1	763	100%	100%	
C	MZ577089	COX-1	615	100%	100%	
D	MZ577090	COX-1	745	100%	100%	
E	MZ577091	COX-1	615	99.84%	100%	KC207825.1 - EUA
F	MZ577092	COX-1	692	100%	100%	
G	MZ577093	COX-1	863	100%	100%	
H	MZ577094	COX-1	758	100%	100%	
A	MZ603871	Cytochrome B	472	100%	100%	
B	MZ603872	Cytochrome B	527	100%	100%	
C	MZ603873	Cytochrome B	520	100%	100%	
D	MZ603874	Cytochrome B	542	100%	100%	
E	MZ603875	Cytochrome B	565	100%	100%	
F	MZ603876	Cytochrome B	526	100%	100%	MK888706.1 - China
G	MZ603877	Cytochrome B	559	100%	100%	
H	MZ603878	Cytochrome B	577	100%	100%	
I	MZ603879	Cytochrome B	560	100%	100%	
J	MZ603880	Cytochrome B	429	100%	100%	

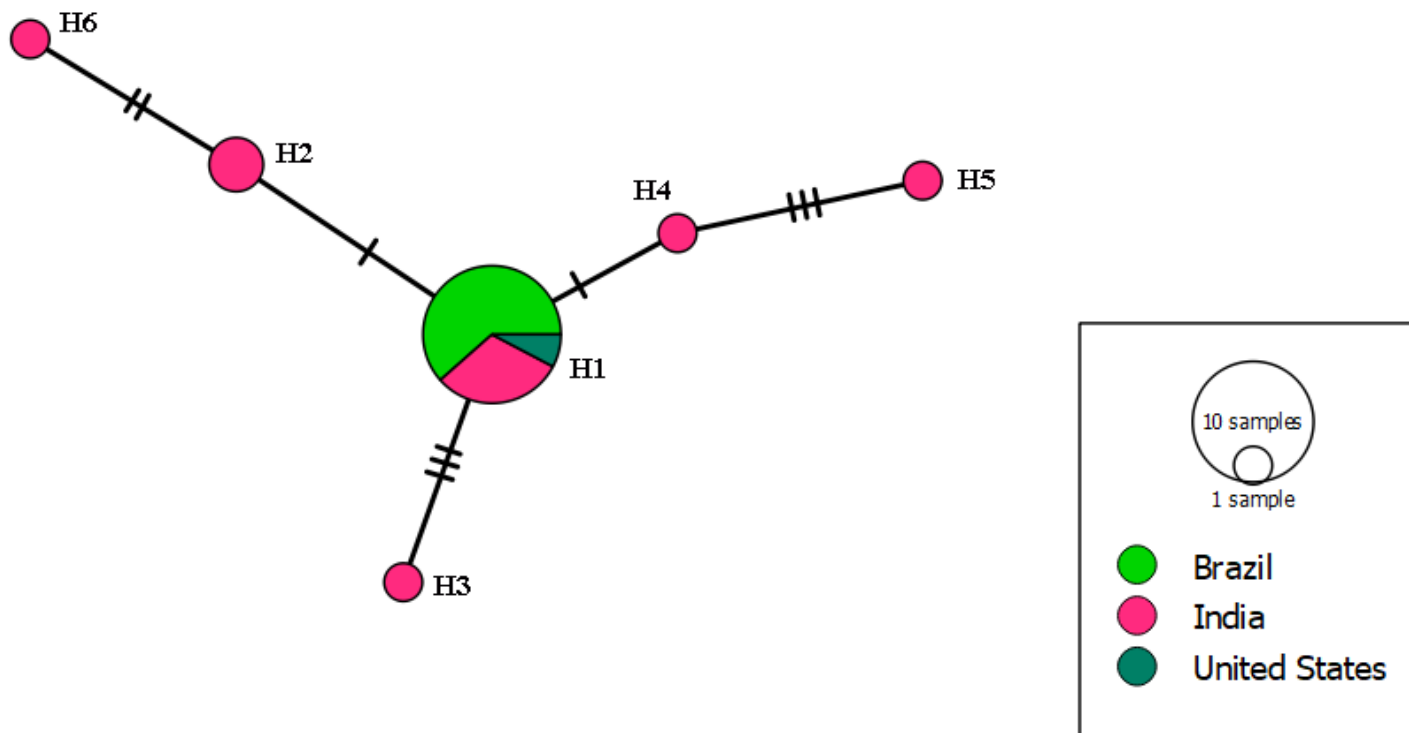


Figure 3 - TCS Network of twenty *Cox-1* partial sequences (402 nt) from *Babesia vogeli* performed in PopART v.1.7 software. Size of circles corresponds to the haplotype frequency; hatch marks represent SNPs separating haplotypes.

Table 6 – Haplotype characterization for *Cox-1* sequences of *Babesia vogeli*

Haplotype number	Gene Bank Access numbers	Origin	Host
H1	MZ577088, MZ577089, MZ577090, MZ577091, MZ577092, MZ577093, MZ577094	Brazil	Domestic dog
H1	KX426022	Brazil	Domestic dog
H1	KC207825	USA	Domestic dog
H1	MN176012; MN176014; MN176017; MN176018	India	Domestic dog
H2	MN176013; MN176016	India	Domestic dog
H3	MN176011	India	Domestic dog
H4	MN176015	India	Domestic dog
H5	MN176019	India	Domestic dog
H6	MN176020	India	Domestic dog

4. Discussion

The molecular tests performed in the present study showed a relatively high prevalence of *Babesia vogeli* (11.23%) compared to the highest prevalence already reported in Brazil, such as from the Midwest, Southeast, and North in the country, with rates of 14.2% (de Sousa et al., 2018), 15.66% (Paulino et al., 2018) and 15.7% (Moraes et al., 2015), respectively. That was not surprising, since *Babesia vogeli* is endemic in Brazil (De Valgas E Bastos et al., 2004; Dantas-Torres and Figueredo, 2006; Trapp et al., 2006a; Dantas-Torres, 2008; Da Silva et al., 2016; Maggi and Krämer, 2019), and the use of molecular techniques as an additional tool for diagnosis has improved the detection power of these hemoparasites (Maggi et al., 2013; Qurollo et al., 2017; Kidd, 2019).

Similar to previous studies from Brazil, we found no statistical difference between the gender of infected and non-infected dogs (Trapp et al., 2006a; O'Dwyer et al., 2009; Barbosa et al., 2020). Regarding age, traditionally *Babesia* spp. is considered to be a disease of young dogs (Solano-Gallego and Baneth, 2011; Silva et al., 2012), or even younger dogs would be more severely affected than the older ones (Köster et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016). However, the greater frequency of adult dogs found in the positive group corroborates with other studies (De Valgas E Bastos et al., 2004; Trapp et al., 2006a; Dantas-Torres and Figueredo, 2006; Da Silva et al., 2016), which could be explained because of the longer exposure of these animals to the transmitter tick (Da Silva et al., 2016). The majority of asymptomatic dogs belonging to the infected group may be associated with the non-pathogenic characteristic of *Babesia vogeli*, known to cause only a mild disease in most cases (Boozer and Macintire, 2003; Schoeman, 2009; Wang et al., 2018).

Microscopic evaluation is the most accessible and the easiest tool for hemoprotozoan diagnosis, although the sensitivity of this method is low (Solano-Gallego

et al., 2016), mainly when there is a low parasitemia in chronic and asymptomatic carrier dogs (Bilić et al., 2018). In agreement, we found Piroplasm inclusions in blood smears in only 1.08% of all infected dogs, the same group comprising nearly 50% (48.88%) of apparently healthy animals.

The laboratory hallmark of canine Babesiosis is usually anemia and thrombocytopenia (Boozer and Macintire, 2003; Köster et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016; Bilić et al., 2018; Schnittger, 2018; Wang et al., 2018; Pantimay and Rodríguez-vivas, 2020), even though infected dogs without clinical signs or laboratory abnormalities, have also been described (Schnittger et al., 2012; Di Cataldo et al., 2020). Despite the fact that we did not identify a significant statistical difference between the hematological parameters regarding these classical alterations, a lower mean Hemoglobin concentration was seen in the positive group was detected compared to the negative one, as well as a greater tendency for anemia in the same group. Furthermore, infected dogs showed more than double the risk of having thrombocytopenia. Anemia can be caused by hemolysis, oxidative damage of erythrocytes, decreased osmotic fragility of red blood cells, and thrombocytopenia can be secondary to the immune-mediated process, splenic sequestration or platelet consumption by vascular injury (Wang et al., 2018; Schnittger, 2018).

It seems that coinfections showed a low impact in our study, as we obtained few samples positive for *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon* sp. or *Leishmania* sp. Nonetheless, these infections could have worsened both symptoms and laboratory abnormalities of anemia and thrombocytopenia levels in almost all coinfecting dogs (Sasanelli et al., 2009; Harrus and Waner, 2011; Rawangchue and Sungpradit, 2020).

Herein, the phylogenetic tree, which positioned our seven isolates in a monophyletic and polytomic clade with isolates from Europe and Brazil, reinforces *Babesia vogeli* as the most prevalent species in Brazil (Dantas-Torres and Figueredo, 2006; Dantas-Torres, 2008), as well as the only species confirmed in Midwest Brazil.

Interestingly, in our mitochondrial LSU4 PCR screening and also using another qPCR 18S rRNA, we detected DNA of *Piroplasm* sp. with very low Identity with our *Babesia vogeli* isolates (65.81%), and no more than 83.76% similarity to *Babesia* sp. EEZA-CRETAV (MW287597.1) from the GenBank isolates. All these four samples were from asymptomatic dogs. Even though we were not able to correctly position those short sequences in a phylogenetic tree (Uilenberg et al., 2018; de Sousa et al., 2018), it is possible to ascribe them to a non-*Babesia vogeli* species. This is interesting, as the only Piroplasm species that infect dogs described in Brazil besides *Babesia vogeli* (Dantas-Torres and Figueredo, 2006; Maggi and Krämer, 2019; Panti-may and Rodríguez-vivas, 2020) are *Rangelia vitalii*, found only in the South and Southeast in the country, and also known to be very pathogenic (Figuera et al., 2010; Soares et al., 2011; Lemos et al., 2012; Malheiros et al., 2016; Gottlieb et al., 2016; Mongruel et al., 2017; Lemos et al., 2017; Silva; et al., 2019; Fournier et al., 2020), in addition to rare cases of *Babesia gibsoni* (Trapp et al., 2006b) and a genotype closely related to *Babesia caballi* (de Sousa et al., 2018), presenting co-infections or no clinical signs, respectively. *Theileria* spp. could be another likely option, as reports around the world have shown most cases in dogs with no symptoms (Qablan et al., 2012; Salim et al., 2019; Bigdeli et al., 2012; Aktas et al., 2015; Rjeibi et al., 2016), although there were no cases of such an agent in dogs from Brazil, to date (Inácio et al., 2019).

Furthermore, since we were unable to detect these parasites in blood smears, all four infected animals were asymptomatic, and we only obtained success in amplifying

those sequences in the qPCRs, it seems that they presented a low parasitemia (Quorollo et al., 2017), a common finding in both chronic infection and carrier dogs (Schnittger, 2018). Therefore, we wondered if these Piroplasm sp. could be species of a new, or at least a known non-pathogenic parasite, infecting dogs as accidental hosts (Criado et al., 2006; de Sousa et al., 2018).

Finally, the same agent was detected in three different areas in the study (kennel, shelter and urban area), which suggests a wider geographic distribution of those piroplasms. This information implies further studies are needed to elucidate the identity and relevance of Piroplasms in the region.

As far as we know, this is the first report of the Haplotype Network of *Babesia vogeli*. In our analysis we obtained from our seven *Cox-1* sequences only one haplotype, while India presented six different ones. However, this same haplotype is shared with other isolates from the USA and India, which could reflect that, although mitochondrial marker *Cox-1* is considered to be less conserved compared to the nuclear 18SrRNA, it has some genetic conservation (Wang et al., 2019). The only haplotype found herein can be explained because, unfortunately, we had a limited number of available sequences and did not clone these sequences. A previous study showed the presence of nine haplotypes of *Babesia canis*, but the authors started from 93 *Cox-1* sequence analysis (Hrazdilová et al., 2019). Even so, our results corroborate with similar and recent studies, which encourage using mitochondrial markers as potential tools for studying the molecular evolution, phylogeny and diversity of Piroplasm species (Schreeg et al., 2016; Hrazdilová et al., 2019; Wang et al., 2019; Panait et al., 2021).

5. Conclusion

We characterized, for the first time in Brasília, Federal District, Midwestern Brazil, Piroplasms in domestic dogs through clinicopathological features and also molecular studies. A tendency of anemia and a greater risk of thrombocytopenia was observed in the infected group. Although we confirmed only *Babesia vogeli* species in our research, we also obtained evidence of another circulating species that could infect dogs from the region. Haplotype network for *Babesia vogeli* apparently showed a low intraspecific variability.

Acknowledgments

The authors would like to thank Federal Agency for the Support and Improvement of Higher Education (CAPES - Finance code 001) for the graduate scholarships granted to Camila Manoel de Oliveira, and Federal District Research Support Foundation (FAPDF) for providing financial support.

Declarations of interest

The authors declare that they have no competing interest.

6. References

- Adamu, M., Troskie, M., Oshadu, D.O., Malatji, D.P., Penzhorn, B.L., Matjila, P.T., 2014. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. *Parasites and Vectors* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-119>
- Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Ipek, N.D.S., Balkaya, I., Utuk, A.E., Klrbas, A., Şimsek, S., Dumanlı, N., 2015. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites and Vectors* 8, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0763-z>
- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., Millán, J., 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and Vectors* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>
- Altschul, S.F., ; Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nbt0388-282>
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L., 2015. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites and Vectors* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0830-5>
- Baneth, G., Cardoso, L., Brilhante-Simões, P., Schnittger, L., 2019. Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. *Parasites and Vectors* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3385-z>
- Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Birkenheuer, A.J., Schreeg, M.E., Prince, H., Florin-Christensen,

- M., Schnittger, L., Aroch, I., 2020. A new piroplasmid species infecting dogs: Morphological and molecular characterization and pathogeny of *Babesia negevi* n. sp. *Parasites and Vectors* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3995-5>
- Barbosa, C.O.S., Garcia, J.R., de Melo Nasser Fava, N., Pereira, D.A., da Cunha, M.J.R., Nachum-Biala, Y., Cury, M.C., Baneth, G., 2020. Babesiosis caused by *Babesia vogeli* in dogs from Uberlândia State of Minas Gerais, Brazil. *Parasitol. Res.* 119, 1173–1176. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06515-3>
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* 39, 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.12.005>
- Bigdeli, M., Rafie, S.M., Namavari, M.M., Jamshidi, S., 2012. Report of *Theileria annulata* and *Babesia canis* infections in dogs. *Comp. Clin. Path.* 21, 375–377. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1505-7>
- Bilić, P., Kuleš, J., Barić Rafaj, R., Mrljak, V., 2018. Canine babesiosis: Where do we stand? *Acta Vet. Brno.* 68, 127–160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>
- Boozer, A.L., Macintire, D.K., 2003. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 885–904, viii. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00039-1)
- Campos, S.D.E., Toma, H.K., Machado, C. de S.C., Assad, R.Q., Almosny, N.R.P., 2018. Novel

- record of a tick *Amblyomma sculptum* with detection of piroplasm *Rangelia vitalii* DNA. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 13, 228–229. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.07.007>
- Carini, A.; Maciel, J. Sobre a molestia dos cães, chamada Nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *An. Paul. Med. Cir.*, 3, 65-71, 1914.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Society 46, 298–303.
- Castro, V.V., Ayres, E. da C.B.S., Canei, D.H., Pereira, M.E., Sousa, V.R.F., Chitarra, C.S., Dutra, V., Nakazato, L., de Almeida, A.D.B.P.F., 2020. Molecular prevalence and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil. *Cienc. Rural* 50, 0–5. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190389>
- Costa-Júnior, L.M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2009. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Res. Vet. Sci.* 86, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.002>
- Costa-Júnior, L.M., Zahler-Rinder, M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2012. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 188, 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.015>
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00078-5)

- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J., 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet. Parasitol.* 142, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.004>
- Da Silva, V.C.L., De Lima, E.R., De Melo Colaço Dias, M.B., Fukahori, F.L.P., De Azevedo Rêgo, M.S., Júnior, J.W.P., De Cássia Peixoto Kim, P., Leitão, R.S.C.S., Mota, R.A., De Oliveira Carieli, E.P., 2016. Parasitological and molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs of Recife, Pernambuco and evaluation of risk factors associated. *Semin. Agrar.* 37, 163–172. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p163>
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., 2006. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Vet. Parasitol.* 141, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>
- Dantas-Torres, F., 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors* 1, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>
- de Sousa, K.C.M., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Freschi, C.R., Machado, R.Z., André, M.R., 2018. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.010>
- De Valgas E Bastos, C., Moreira, S.M., Passos, L.M.F., 2004. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 158–160. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.023>
- Di Cataldo, S., Ulloa-Contreras, C., Cevidanes, A., Hernández, C., Millán, J., 2020. *Babesia vogeli* in dogs in Chile. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 2296–2299.

<https://doi.org/10.1111/tbed.13609>

Díaz-Regañón, D., Agulla, B., Piya, B., Fernández-Ruiz, N., Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Sainz, Á., 2020. Stray dogs in Nepal have high prevalence of vector-borne pathogens: A molecular survey. *Parasites and Vectors* 13, 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04057-7>

Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 974–987. <https://doi.org/1590/S0100-736X2010001100012>

Fournier, G.F. da S.R., Pinter, A., Muñoz-Leal, S., Labruna, M.B., Lopes, M.G., Martins, T.F., Colácio, L., Môra, C.R.S., Moraes-Filho, J., Dias, R.A., 2020. Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29, 1–17.

<https://doi.org/10.1590/s1984-29612020003>

Fritz, D., 2010. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol. Res.* 106, 1339–1342. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1804-3>

Gottlieb, J., André, M.R., Soares, J.F., Gonçalves, L.R., Tonial de Oliveira, M., Costa, M.M., Labruna, M.B., Bortolini, C.E., Machado, R.Z., Vieira, M.I.B., 2016. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. E *Ehrlichia* spp. em cães de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 172–178. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016041>

- Habibi, G., Imani, A., Afshari, A., Bozorgi, S., 2020. Detection and molecular characterization of babesia canis vogeli and theileria annulata in free-ranging dogs and ticks from shahriar county, tehran province, iran. Iran. J. Parasitol. 15, 321–331.
<https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i3.4196>
- Harrus, S., Waner, T., 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. Vet. J. 187, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Hrazdilová, K., Myśliwy, I., Hildebrand, J., Buńkowska-Gawlik, K., Janaczyk, B., Percec-Matysiak, A., Modrý, D., 2019. Paralogs vs. genotypes? Variability of Babesia canis assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. Vet. Parasitol. 266, 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.017>
- Inácio, E.L., Pérez-Macchi, S., Alabi, A., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. Ticks Tick. Borne. Dis. 10, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>
- Irwin, P.J., 2014. It shouldn't happen to a dog . . . or a veterinarian: Clinical paradigms for canine vector-borne diseases. Trends Parasitol. 30, 104–112.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.001>
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2007. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. Vet. Parasitol. 144, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K.Y., Waziri, N.E., Eyal, O., Guthmann, Y., Harrus, S., 2013. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 1–7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>

Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L., 2008. Clinical biochemistry of domestic animals.

Academic press.

Kidd, L., 2019. Optimal Vector-borne Disease Screening in Dogs Using Both Serology-based

and Polymerase Chain Reaction–based Diagnostic Panels. *Vet. Clin. North Am. - Small*

Anim. Pract. 49, 703–718. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.011>

Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. Babesia

conradae, sp. nov., a small canine Babesia identified in California. *Vet. Parasitol.* 138,

103–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.044>

Köster, L.S., Lobetti, R.G., Kelly, P., 2015. Canine babesiosis: a perspective on clinical

complications, biomarkers, and treatment. *Vet. Med. Res. Reports* 6, 119–128.

Lack, J.B., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., 2012. Phylogeny and evolution of the

Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 42, 353–363.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>

Lemos, T.D., Cerqueira, A. de M.F., Toma, H.K., da Silva, A.V., Corrêa, R.G.B., Paludo, G.R.,

Massard, C.L., Almosny, N.R.P., 2012. Detection and molecular characterization of

piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.*

Vet. 21, 137–142. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000200012>

Lemos, T.D., Toma, H.K., Assad, R.Q., Da Silva, A.V., Corrêa, R.G.B., Almosny, N.R.P., 2017.

Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalii*-naturally infected dogs in

southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 307–313.

<https://doi.org/10.1590/S1984-29612017040>

- Lopes, S.T.A., Loretti, A.P., Mazzanti, C.M., França, R.T., Da Silva, A.S., 2014. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day – A review. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.005>
- Maggi, R.G., Birkenheuer, A.J., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2013. Advantages and Limitations of Serological and Molecular Panels for the Diagnosis of Vector-Borne Infectious Diseases in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 720.
- Maggi, R.G., Krämer, F., 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites and Vectors.* <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Malheiros, J., Costa, M.M., do Amaral, R.B., de Sousa, K.C.M., André, M.R., Machado, R.Z., Vieira, M.I.B., 2016. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>
- Matjila, P. T., Leisewitz, A.L., Oosthuizen, M.C., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008a. Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 157, 34–40.
- Matjila, Paul Tshepo, Leisewitz, A.L., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008b. Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 155, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.012>
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.025>
- Mongruel, A.C.B., Stedile, S.T. de O., Sousa, M.G., Valente, J.D., Barbosa, I.C., Spanhol, V.C., Sezyshta, A., Weber, L.F.S., Vieira, T.S.W.J., Vieira, R.F. da C., 2017. Molecular Detection of *Rangelia Vitalii* in a Dog From the Curitiba Metropolitan Region, Parana State,

- Southern Brazil. Arch. Vet. Sci. 22, 139–144. <https://doi.org/10.5380/avs.v22i4.56936>
- Moraes, P.H.G., Rufino, C.P., Reis, T., Aguiar, D.C.F., Meneses, A.M.C., Gonçalves, E.C., 2014. Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23, 105–108. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014017>
- Moraes, P.H.G., Rufino, C.P., Baraúna, A.R.F., Reis, T., Agnol, L.T.D., 2015. Molecular characterization in dogs from Belém , northern Brazil. Genet. Mol. Res. 14, 16364–16371.
- Murphy, G.L., Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J.C., Kocan, A.A., 1998. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. Vet. Parasitol. 79, 325–339. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00179-4)
- Nascimento, A.L. da C.P., Ferreira, J.D.C., Moura, G.J.B. de, 2013. Marsupiais de uma área de caatinga (Pernambuco, Brasil) com registro de nova localidade para Caluromys philander (Linnaeus, 1758). Rev. Ibero-Americana Ciências Ambient. 4, 104. <https://doi.org/10.6008/ess2179-6858.2013.001.0008>
- O'Dwyer, L.H., Lopes, V. von A., Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Ribolla, P.E.M., 2009. Babesia spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 23–26. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01802005>
- Oliveira, L.P., Cardozo, G.P., Santos, E.V., Mansur, M.A.B., Donini, I.A.N., Zissou, V.G., Roberto, P.G., Marins, M., 2009. Molecular analysis of the rRNA genes of Babesia spp and Ehrlichia canis detected in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. Brazilian J. Microbiol. 40, 238–240. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000200006>

- Paim, C.B., Lopes, S.T.A., França, R.T., Soares, J.F., Da Silva, A.S., Dornelles, G.L., Monteiro, S.G., Labruna, M.B., Costa, M.M., Mazzanti, C.M., Paim, F.C., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp. Parasitol.* 128, 347–352.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.010>
- Panait, L.C., Mihalca, A.D., Modrý, D., Juránková, J., Ionică, A.M., Deak, G., Gherman, C.M., Heddergott, M., Hodžić, A., Veronesi, F., Reichard, M., Ziemann, E.A., Nielsen, C.K., Jiménez-Ruiz, F.A., Hrazdilová, K., 2021. Three new species of *Cytauxzoon* in European wild felids. *Vet. Parasitol.* 290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109344>
- Panti-may, J.A., Rodríguez-vivas, R.I., 2020. Canine babesiosis : A literature review of prevalence , distribution , and diagnosis in Latin America and the Caribbean. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 21, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>
- Passos, L.M.F., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Zahler-Rinder, M., 2005. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 81–85.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.028>
- Paulino, P.G., Pires, M.S., da Silva, C.B., Peckle, M., da Costa, R.L., Vitari, G.L.V., de Abreu, A.P.M., Massard, C.L., Santos, H.A., 2018. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 13, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.06.004>
- Qablan, M.A., Kubelová, M., Široký, P., Modrý, D., Amr, Z.S., 2012. Stray dogs of northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitol. Res.* 111, 301–307. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2839-4>

- Qurollo, B.A., Archer, N.R., Schreeg, M.E., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Haney, K.N., Thomas, B.S., Breitschwerdt, E.B., 2017. Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2064-1>
- Ramos, R., Ramos, C., Araújo, F., Oliveira, R., Souza, I., Pimentel, D., Galindo, M., Santana, M., Rosas, E., Faustino, M., Alves, L., 2010. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol. Res.* 107, 1115–1120. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7>
- Rawangchue, T., Sungpradit, S., 2020. Clinicopathological and molecular profiles of Babesia vogeli infection and Ehrlichia canis coinfection. *Vet. World* 13, 1294–1302. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1294-1302>
- Ribeiro, C.M., Matos, A.C., Azzolini, T., Bones, E.R., Wasnieski, E.A., Richini-Pereira, V.B., Lucheis, S.B., Vidotto, O., 2017. Molecular epidemiology of Anaplasma platys, Ehrlichia canis and Babesia vogeli in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 37, 129–136. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000200006>
- Rjeibi, M.R., Amairia, S., Rouatbi, M., Ben Salem, F., Mabrouk, M., Gharbi, M., 2016. Molecular prevalence and genetic characterization of piroplasms in dogs from Tunisia. *Parasitology* 143, 1622–1628. <https://doi.org/10.1017/S003118201600113X>
- Rosa, C.T., Pazzi, P., Nagel, S., McClure, V., Christie, J., Troskie, M., Dvir, E., 2014. Theileriosis in six dogs in South Africa and its potential clinical significance. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 85, 1–7. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1114>

- Rotondano, T.E. de F., Almeida, H.K.A., Krawczak, F. da S., Santana, V.L., Vidal, I.F., Labruna, M.B., de Azevedo, S.S., de Almeida, A.M.P., de Melo, M.A., 2015. Survey of Ehrlichia canis, Babesia spp. and Hepatozoon spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal 24, 52–58.
- Salim, B., Alanazi, A.D., Omori, R., Alyousif, M.S., Alanazi, I.O., Katakura, K., Nakao, R., 2019. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. Acta Trop. 193, 78–83.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.029>
- Sasanelli, M., Paradies, P., Lubas, G., Otranto, D., De Caprariis, D., 2009. Atypical clinical presentation of coinfection with Ehrlichia, Babesia and Hepatozoon species in a dog. Vet. Rec. 164, 22–23. <https://doi.org/10.1136/vr.164.1.22>
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. Babesia: A world emerging. Infect. Genet. Evol. 12, 1788–1809.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Schnittger, M.F.-C.L., 2018. Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets, Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_3
- Schoeman, 2009. Canine Babesiosis. Onderstepoort J. Vet. Res. 76, 59–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.08.001>
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47, 349–358.
[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)

Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J.L., Cohn, L.A., Bird, D.M., Scholl, E.H., Levy, M.G.,

Wiegmann, B.M., Birkenheuer, A.J., 2016. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS One* 11, 1–27.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>

Sili, G., Byaruhanga, C., Horak, I., Steyn, H., Chaisi, M., Oosthuizen, M.C., Neves, L., 2021.

Ticks and tick-borne pathogens infecting livestock and dogs in Tchicala-Tcholoanga, Huambo Province, Angola. *Parasitol. Res.* 120, 1097–1102.

<https://doi.org/10.1007/s00436-020-07009-3>

Silva, A.B., Costa, A.P., De Sá, J.C., Costa, F.B., Dos Santos, A.C.G., De Candanedo Guerra,

R.D.M.S.N., 2012. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro.

Cienc. Anim. Bras. 13, 388–395. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i3.18439>

Silva, B.R. da, Kuteques, F.M. de F., Maffezzolli, Gabriela, Koch, Marília de Oliveira, ;,

Beltrame, O.C., Taques, Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro, Campos, Amanda Noéli da

Silva, Aguiar, D.M. de, Dittrich, Rosangela Locatelli, 2019. Detection molecular of

Rangelia vitalii in dogs from Parana State, Southern Brazil. *Brazilian J. Vet. Parasitol.*

2961, 310–313.

Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Labruna,

M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil.

Vet. Parasitol. 180, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>

Soares, J.F., Costa, F.B., Giroto-Soares, A., Da Silva, A.S., França, R.T., Taniwaki, S.A.,

Dall’Agnol, B., Reck, J., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B., 2018. Evaluation of the vector

competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelioidosis. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1221–1234.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.004>

Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.* 181, 48–60.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>

Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. A review of canine babesiosis: The European perspective. *Parasites and Vectors* 9, 1–18.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>

Sousa, K.C.M. de, André, M.R., Herrera, H.M., Andrade, G.B. de, Jusi, M.M.G., Santos, L.L.

dos, Barreto, W.T.G., Machado, R.Z., Oliveira, G.P. de, 2013. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 525–531.

<https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000400012>

Spolidorio, M.G., de Medeiros Torres, M., da Silva Campos, W.N., Melo, A.L.T., Igarashi, M., Amude, A.M., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., 2011. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 253–255. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000300015>

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., de Moraes, H.S.A., 2006a. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 140, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>

Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., de Moraes, H.S.A., 2006b. *Babesia gibsoni*

genotype Asia in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 141, 177–180.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>

Tyrrell, J.D., Quorollo, B.A., Tornquist, S.J., Schlaich, K.G., Kelsey, J., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E.B., 2019. Molecular identification of vector-borne organisms in Ehrlichia seropositive Nicaraguan horses and first report of Rickettsia felis infection in the horse. *Acta Trop.* 200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105170>

Uilenberg, G., 2006. Babesia-A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

Uilenberg, G., Gray, J., Kahl, O., 2018. Research on Piroplasmorida and other tick-borne agents: Are we going the right way? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 860–863.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.005>

Vieira, F. de T., Acosta, I.C.L., Martins, T.F., Filho, J.M., Krawczak, F. da S., Barbieri, A.R.M., Egert, L., Fernandes, D.R., Braga, F.R., Labruna, M.B., Dietze, R., 2018. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 249, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.005>

Wang, J., Zhang, J., Kelly, P., Zheng, X., Li, M., You, J., Huang, K., Qiu, H., Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Dong, J., Feng, Y., Zhou, J., Wang, C., 2018. First description of the pathogenicity of Babesia vogeli in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 253, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.028>

Wang, T., Zhang, S., Pei, T., Yu, Z., Liu, J., 2019. Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications. *Parasit. Vectors* 12, 451.

<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3705-3>

Weiss, D.J., Wardrop, K., 2011. Schalm's Veterinary Hematology. John Wiley & Sons.

Xu, D., Zhang, J., Shi, Z., Song, C., Zheng, X., Zhang, Y., Hao, Y., Dong, H., Wei, L., El-

Mahallawy, H.S., Kelly, P., Xiong, W., Wang, H., Li, J., Zhang, X., Gu, J., Wang, C., 2015.

Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China.

Parasites and Vectors 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1120-y>

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate

between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs.

Parasitol. Res. 84, 544–548. <https://doi.org/10.1007/s004360050445>

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Caracterizamos pela primeira vez em Brasília, Distrito Federal, a ocorrência e as manifestações clínicas e laboratoriais de cães e gatos infectados por piroplasmídeos. Apesar das limitações que ocorreram durante o período de realização do estudo devido à pandemia do Coronavírus, importantes parcerias foram formadas. Além da contribuição da equipe do Dr. Adam Birkenheuer, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, a cooperação do professor Marcos André abrilhantou nossas pesquisas. Adicionalmente, a colaboração de cada co-autor foi crucial para a produção final dos artigos. Com isso, importantes e novos caminhos foram descobertos para o estudo.

Com relação aos piroplasmídeos de gatos, nossa análise molecular poderá contribuir para o estudo futuro da diversidade desses agentes, já que fizemos o primeiro depósito do GenBank de sequência de *Babesia vogeli* do gene *Cox-1* de gato doméstico. Posteriormente, com mais sequências depositadas por outros pesquisadores, a filogeografia desses agentes poderá ser mais bem analisada. Instigamos também o estudo comparativo de sequências de *Cytauxzoon* sp. de isolados aqui do Brasil com o *C.felis* encontrado nos Estados Unidos. Ficou evidente a diferença de manifestações clínicas entre os agentes encontrados no nosso trabalho com aquelas apresentadas por isolados norte-americanos. Por outro lado, o simples fato de considerar que nosso isolado é diferente também não

explica os casos assintomáticos também causados por *C. felis* nos Estados Unidos, tampouco o caso de infecção fatal em felino selvagem relatado aqui no Brasil. Análises moleculares comparativas entre os isolados dos dois países serão úteis na elucidação dessa questão de patogenicidade. Técnicas mais avançadas de biologia molecular e bioinformática deverão auxiliar na obtenção de fragmentos de sequências maiores, necessários para a comparação fidedigna entre esses isolados. Até o momento, essas sequências mais longas são difíceis de serem amplificadas em amostras com baixa parasitemia, como as que parecem ocorrer no Brasil.

Ainda sobre a Cytauxzoonose, há uma grande lacuna no Brasil acerca da transmissão de seu agente causador. Diferentemente do que ocorre nos EUA, carrapatos que infectam gatos domésticos não são observados frequentemente aqui no país. Além disso, no Brasil ocorrem espécies diferentes de carrapatos, que não são aquelas comprovadamente consideradas vetores de *C. felis*. Isso faz com que a hipótese de via alternativa de infecção possa ser a regra no Brasil, ao invés de exceção. Para se elucidar essa questão, estudos experimentais controlados devem ser conduzidos para que esse tipo de infecção possa ser comprovada.

Quanto aos cães domésticos, a identificação de um protozoário diferente de *B. vogeli*, espécie de piroplasmídeo de maior ocorrência no Brasil, indica que há a presença de outros agentes no país que precisam ser melhor investigados. A hipótese de *spill over* poderia ser considerada, mas o real papel das infecções por esses piroplasmídeos ainda carece de estudos. Nesse sentido, ferramentas diagnósticas mais sensíveis, como a qPCR e o uso de genes mitocondriais, que são menos conservados que os tradicionais 18S (muito utilizados para fins diagnósticos) podem auxiliar no rastreamento e estudo desses parasitas.

Apesar de não termos identificado casos de *Rangelia vitalii* no nosso estudo, mais estudos sobre esse agente são necessários. Lacunas como o entendimento sobre seu ciclo biológico, bem como a definição sobre seu posicionamento em clado distinto de *Babesia* sensu strictu, precisam ser preenchidas.

Felizmente no Brasil cada vez mais análises moleculares estão sendo realizadas, o que possivelmente vem se traduzindo em ocorrências cada vez maiores de piroplasmídeos no país. No entanto, faltam estudos nacionais experimentais que investiguem melhor as relações epidemiológicas entre seus vetores. Informações sobre a ocorrência e também sobre a transmissão desses agentes no país poderão contribuir para a elucidação do papel deles na infecção de cães e gatos domésticos aqui no Brasil.

