

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR *Babesia* spp. E
Hepatozoon spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis domesticus*) DO
ESTADO DE SÃO PAULO E DO DISTRITO FEDERAL**

MARCELLA PIRES MENDES CARNEIRO

Botucatu - SP

Julho de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR *Babesia* spp. E
Hepatozoon spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis domesticus*) DO
ESTADO DE SÃO PAULO E DO DISTRITO FEDERAL**

MARCELLA PIRES MENDES CARNEIRO

**Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre**

**Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena
O'Dwyer de Oliveira.**

**Botucatu - SP
Julho de 2007**

MARCELLA PIRES MENDES CARNEIRO

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR *Babesia* spp. E
Hepatozoon spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis domesticus*) DO
ESTADO DE SÃO PAULO E DO DISTRITO FEDERAL**

Aprovada em 31 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Prof^a. Adj. Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira

Prof^a. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani

**Botucatu - SP
07/2007**

Aos meus pais

que não mediram esforços para garantir minha educação e por todo
apoio e estímulo nas horas em que fraquejei.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e de todos, agradeço a Deus, por ter me dado força e coragem para suportar todas as adversidades durante esse período.

Aos meus pais, José Sarto e Mônica, por acreditarem que mais esse passo seria possível, apesar de todas as dificuldades.

Ao meu irmão Sartinho, por todo o carinho e ajuda, principalmente nas minhas “brigas” com o computador.

A todos os meus familiares, que nunca deixaram de se preocupar comigo, mesmo com minha longa temporada em Botucatu, sempre oferecendo ajuda e dando incentivos.

Em especial, à Lucia, pela plena confiança e pela inestimável ajuda na execução deste trabalho. Não esquecendo as horas agradáveis de descontração nos eventuais encontros da galera da parasito.

Ao meu eterno namorado, noivo e agora marido, Renato, por todo o amor nesses anos de convívio, pela compreensão e paciência nas minhas longas ausências decorrentes do mestrado.

A doutoranda Karina Paduan, pela ajuda indescritível e contribuição que me foi dada durante a elaboração da dissertação e pela paciência e disposição na realização do seqüenciamento e análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Paulo Ribolla, por inúmeras vezes disponibilizar reagentes e seus laboratórios para a realização dos experimentos de biologia molecular e por repassar seu vasto conhecimento quando as dúvidas surgiram. E aos seus orientados, Jayme, Aline, Letícia, Bianca, Diego e Alberto, pela paciência e convívio amigável na “salinha” da parasito.

A Profa. Dra. Teresa Cristina, uma pessoa de coração gigante, por permitir o uso de seu laboratório para a realização deste experimento e pelos conselhos pessoais e acadêmicos. Ao seu orientado Gustavo Cavalcante, pelos ensinamentos de Biologia Molecular e pelos bons momentos no departamento e na Fazenda de São Manoel, fugindo de coices e cabeçadas.

Aos companheiros de mestrado, Viviane e Adriano, pela amizade e troca de conhecimento. Sem essas duas “figuras” a PCR ainda seria um monstro de dez cabeças. E pelos inesquecíveis churrascos da Parasito, com horas intermináveis de cantoria, dança e bebedeira.

As amigas Viviane, Satie, Telma e Karina, que representaram a razão para eu não desistir, tornando mais feliz a minha jornada longe de casa, pela “hospedagem”, pela ajuda com o experimento e pelas boas lembranças que levarei para sempre em meu coração.

A Renata Queiroz de Melo, colega de profissão e acima de tudo amiga, sem a qual provavelmente não teria escolhido esse caminho.

A Renara Guedes, pela amizade eterna que nenhuma distância é capaz de apagar.

As amigas de graduação e companheiras de república e balada, Adriana, Ana Carolina e Veruska, pelos anos de convívio, sempre me ajudando a tomar decisões e esquecer um pouco a saudade com longas conversas e horas intermináveis de risadas.

Aos amigos, Marco e Vitor “mamuska” por alegrar a vida de qualquer um que cruze seus caminhos.

A todos os professores do Departamento, em especial ao professores Alessandro e Reinaldo, pelo incentivo e pelos bons momentos de descontração nos churrascos da parasito.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia e amigos, Valdir, Bixo, Márcia, Ângela e Nilza, pelos bons momentos de risadas, e “falação de besteira” nos corredores e festas do departamento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Posso ter defeitos, viver ansiosa e ficar irritada algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que seja injusta. Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa
(com adaptações)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Coleta de sangue de gato doméstico por meio da punção da veia jugular.....**31**

FIGURA 2. Trofozoítos de *Babesia* sp. (seta) observados na lâmina de esfregaço sangüíneo do sangue de gato, corado com Giemsa, em aumento de 1.000x.....**39**

FIGURA 3. Eletroforese do produto amplificado de DNA para *Babesia* spp., em gato, pela técnica de PCR. Amostra 1 positiva para presença de *Babesia* spp. Amostras 2 e 3 utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. PM: Padrão de peso molecular de 100pb.....**40**

FIGURA 4. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Os sítios polimórficos são evidenciados pela ausência do símbolo (*). Os símbolos (-) representam a ausência de nucleotídeos (gaps)..**42**

FIGURA 5. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene rDNA de *Babesia* sp. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Babesia canis vogeli* (USA, Egypti, Okinawa, Brazil), *Babesia canis canis* (Rússia, Europa), *Babesia canis rossi*, *Babesia ovis* e *Babesia felis* obtidas no GenBank foram utilizadas como outgroup. Gato Brasil-amostra de *B. c. vogeli* de um gato de área urbana do estado de São Paulo. **44**

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleosídeos Trifosfatos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	“Enzyme-Linked Imunosorbent Assay”
IFI	Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
M	Molar
mL	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	“Polimerase Chain Reaction”
pH	Potencial hidrogeniônico
Pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unidade internacional de medida

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. <i>Babesia</i> spp. em gatos.....	5
2.1.1. Histórico e Etiologia.....	5
2.1.2. Epidemiologia.....	8
2.1.3. Ciclo Biológico e Transmissão.....	9
2.1.4. Patogenia e Patogenicidade.....	10
2.1.5. Sinais Clínicos.....	11
2.1.6. Diagnóstico.....	12
2.1.6.1. Diagnóstico Laboratorial.....	12
2.1.6.1.1. Exame de esfregaço sangüíneo.....	12
2.1.6.1.2. Hematologia e Bioquímica sérica.....	13
2.1.6.1.3. Sorologia.....	14
2.1.6.2. Diagnóstico Molecular.....	14
2.2. <i>Hepatozoon</i> spp. em gatos.....	17
2.2.1. Histórico e Etiologia.....	17
2.2.2. Epidemiologia.....	17
2.2.3. Ciclo Biológico e Transmissão.....	19
2.2.4. Patogenia e Patogenicidade.....	20
2.2.5. Sinais Clínicos.....	21
2.2.6. Diagnóstico.....	22
2.2.6.1. Diagnóstico Laboratorial.....	22
2.2.6.1.1. Exame de esfregaço sangüíneo.....	22
2.2.6.1.2. Histologia.....	23
2.2.6.1.3. Hematologia.....	24
2.2.6.1.4. Bioquímica.....	25
2.2.6.1.5. Sorologia.....	26
2.2.6.2. Diagnóstico Molecular.....	26
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31

4.1. Seleção dos animais.....	31
4.2. Coleta de sangue.....	32
4.3. Pesquisa de carrapatos.....	32
4.4. Acondicionamento das amostras.....	32
4.5. Processamento das amostras.....	32
4.5.1. Esfregaços sangüíneos.....	32
4.5.2. Extração de DNA genômico.....	33
4.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
4.6.1. Obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	33
4.6.2. Amplificação de seqüência genética de <i>Babesia</i> sp.....	34
4.6.3. Amplificação de seqüência genética de <i>Hepatozoon</i> sp... gel de Agarose.....	34
4.7. Visualização dos produtos de amplificação por Eletroforese em gel de Agarose.....	35
4.8. Purificação dos produtos de PCR.....	36
4.9. Reação de seqüenciamento.....	36
4.10. Precipitação.....	37
4.11. Análise das seqüências.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Esfregaço sangüíneo.....	39
5.2. Procura de carrapatos.....	40
5.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	40
5.4. Seqüenciamento.....	41
5.5. Análise filogenética.....	43
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

Carneiro, M. P. P. Ocorrência de infecções por *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos (*Felis domesticus*) do Estado de São Paulo e do Distrito Federal. Botucatu, 2007. 64f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência da infecção por parasitas dos gêneros *Babesia* e *Hepatozoon* em gatos domésticos, por meio da identificação em esfregaços sangüíneos corados por Giemsa e pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Foram colhidas amostras de sangue de 144 animais, sendo 113 do Estado de São Paulo e 31 do Distrito Federal. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e não foram feitas distinções quanto à raça, idade, sexo ou estado de saúde dos gatos. A maioria dos animais habitava áreas rurais (52,8%) e, quando urbanas (47,2%), eram animais com livre acesso à rua. A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, de acordo com as recomendações do fabricante. Para a realização da PCR foram utilizados os oligonucleotídeos PiroA1 e PiroB para *Babesia* spp. e HepF e HepR para *Hepatozoon* spp. Pela análise dos esfregaços sangüíneos foram observadas estruturas intraeritrocitárias semelhantes à piroplasmídeos em cinco (3,47%) gatos, porém, apenas um (0,69%) foi positivo pela PCR para *Babesia* sp., com banda visualizada em 450pb. O seqüenciamento dessa amostra positiva demonstrou 100% de similaridade com *Babesia canis vogeli* já caracterizada no Brasil. Todas as amostras foram negativas para *Hepatozoon* spp., tanto pelo esfregaço quanto pela PCR. Por meio dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a freqüência desses hemoparasitas em gatos domésticos nessas regiões é muito baixa e técnicas moleculares são necessárias para o correto diagnóstico dessas hemoparasitoses nesses animais.

ABSTRACT

Carneiro, M. P. M. Occurrence of *Babesia* sp. and *Hepatozoon* sp. infection in domestic cats (*Felis domesticus*) of São Paulo state and the Federal District. Botucatu, 2007. 66f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of infection by parasites of the genus *Babesia* and *Hepatozoon* in domestic cats. Infection was identified using Giemsa stained blood smears and the Polymerase Chain Reaction (PCR). The blood samples were collected from one hundred and forty four (144) cats that resided in São Paulo (113) state and the Federal District (31). The DNA extraction of blood samples was performed with the GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, according to the manufacturer's instructions. The PiroA1 and PiroB primers for *Babesia* spp. and the HepF and HepF primers for *Hepatozoon* spp were used for PCR execution. Blood smear examinations, demonstrated the presence of intraerythrocytic structures resembling piroplasmids in five (3.47%) cats, however, only one (0.69%) was positive for *Babesia* sp., by PCR, with a band visualized at 450 bp. The sequencing of this positive sample demonstrated close identity with *Babesia canis vogeli*, which has already been characterized in Brazil. All blood smear and PCR samples were negative for *Hepatozoon* spp. The frequency of these hemoparasites in domestic cats in Brazil is very low and molecular techniques are necessary for the correct diagnostic of these hemoparasitosis in these animals.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dentre os hemoparasitas que acometem gatos domésticos e que são transmitidos por carrapatos, os de maior importância são protozoários dos gêneros *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. e *Hepatozoon* spp., além de bactérias gram negativas, como *Mycoplasma* spp. (hemoplasma) e *Ehrlichia* spp. (SHAW *et al.*, 2001).

Entre os piroplasmídeos várias espécies já foram descritas em felinos: *Babesia felis*; *Babesia cati*; *Babesia herpailuri*; *Babesia pantherae*; *Babesia leo*; *Babesia canis* e *Cytauxzoon felis* (BANETH *et al.*, 2004; BOURDEAU, 1996). Entretanto, devido à semelhança dos estágios intraeritrocitários torna-se difícil a identificação e o diagnóstico microscópico desses parasitas. No Brasil, com exceção dos hemoplasmas, os hemoparasitas de gatos são pouco conhecidos, existindo somente relatos esporádicos de piroplasmídeos de espécies não identificadas (MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004), de *Ehrlichia* sp. (ALMOSNY *et al.*, 1998) e, recentemente, de *Hepatozoon* sp. (PEREZ *et al.*, 2004). Apesar disso, são poucos os relatos envolvendo biologia molecular no diagnóstico das hemoparasitoses de felinos no mundo.

Sabe-se que os gatos parecem ser menos predispostos às infestações por carrapatos e aos parasitas transmitidos por esses artrópodes do que os cães (SHAW *et al.*, 2001). Além disso, esses animais têm uma suposta resistência inata ou adaptação às infecções, o que limita o desenvolvimento das doenças ou compromete a transmissão de agentes infecciosos entre carrapatos e gatos (SHAW *et al.*, 2001).

A natureza inespecífica dos sinais clínicos em gatos infectados associada à baixa sensibilidade e especificidade da técnica do esfregaço sangüíneo podem ter resultado no subdiagnóstico desses parasitas no Brasil. Mas é necessário lembrar que, apesar da escassez de conhecimento sobre o assunto, da falta de relatos e de realização do diagnóstico, a infecção em gatos por *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. existe no Brasil (MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004, PEREZ *et al.*, 2004) e estes agentes estão presentes como parasitas potenciais e que devem receber mais atenção por parte dos médicos veterinários e, mais ainda, pelos pesquisadores.

Nos últimos anos houve um maior avanço no entendimento das infecções transmitidas por carrapatos devido à aplicação de técnicas moleculares, em particular a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizadas no diagnóstico e identificação desses agentes. As recentes pesquisas envolvendo biologia molecular e parasitas dos gêneros *Babesia* e *Hepatozoon* em gatos domésticos (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2004; RUBINI *et al.*, 2006) confirmam a idéia de que esses parasitas estão presentes nesses animais e demonstram a necessidade de estudos mais detalhados sobre esses agentes no Brasil.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Babesia spp. em gatos

2.1.1. HISTÓRICO E ETIOLOGIA

Parasitas do gênero *Babesia* são piroplasmas intraeritrocitários obrigatórios transmitidos por carrapatos e são encontrados em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens e seres humanos. Atualmente, seis espécies desse protozoário são reconhecidas como parasitas de felinos: *B. felis*; *B. cati*; *B. herpailuri*, *B. pantherae*, *B. leo* e *B. canis* (BOURDEAU, 1996; SCHOEMAN *et al.*, 2001; BANETH *et al.*, 2004). Dessas espécies, apenas quatro foram relatadas acometendo gatos domésticos: *B. felis*, *B. cati*, *B. canis* e *B. leo* (BOURDEAU, 1996; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; BANETH *et al.*, 2004; BOSMAN *et al.*, 2006). Os piroplasmídeos de gatos possuem formas muito similares, sendo difícil sua identificação baseada somente nas formas intraeritrocitárias (GLENN *et al.*, 1982). *Babesia felis* é um pequeno piroplasma que mede de 0,3 a 0,9 μm . Essa espécie comumente forma tétrades. *Babesia cati* e *B. leo* medem de 0,5 a 2,5 μm e apresentam predominantemente formas anelares e ovaladas. *Babesia herpailuri* e *B. canis* são grandes babesias, medindo em média 2,7 μm , com o predomínio de formas bigeminadas (BOURDEAU, 1996).

A babesiose em gatos não tem recebido muita atenção por parte dos pesquisadores; talvez por ser esporadicamente relatada ou por não causar doença clínica significativa. Sendo assim, pouco se sabe sobre os babesídeos que infectam gatos domésticos.

A ocorrência de babesiose em felídeos foi primeiramente relatada na Índia por Lingard & Jennings em 1904 (como citado por MANGRULKAR, 1937). No entanto, na ocasião, esses autores não descreveram e nem mesmo ilustraram o parasita causador da doença. Essa observação não foi confirmada até que DAVIS (1929) estudou e descreveu as características morfológicas dos pequenos piroplasmídeos encontrados em gatos selvagens sudaneses (*Felis ocreata* syn.

Felis sylvestris), denominando os parasitas de *Babesia felis*. O parasita foi experimentalmente transmitido para gatos domésticos, mas, apesar desses animais terem sido susceptíveis à infecção, não apresentaram qualquer sinal de doença clínica.

Em 1930, WENYON & HAMERTON descreveram um piroplasma em um felino selvagem (*Felis rufa*) com características semelhantes à *B. felis* descrita por DAVIS. No entanto, a diferença de tamanho e no número de merozoítos produzidos não eram motivos suficientes para o reconhecimento de uma nova espécie.

Subseqüentemente, CARPANO (1934) relatou o encontro de um novo piroplasma em pumas (*Felis concolor*) semelhante à *B. gibsoni* e afirmou que o organismo também poderia ser transmitido para outros felinos locais, incluindo *Felis domesticus* e *Felis ocreata*, os quais eram infestados pelo carrapato *Rhipicephalus simus*. Esse autor propôs o nome *Babesiella felis* para esse parasita e sugeriu que o parasita encontrado por DAVIS fosse denominado *Nuttallia felis*, talvez devido à presença de tétrades, ou seja, de formas em cruz de Malta.

JACKSON & DUNNING (1937) relataram pela primeira vez a ocorrência de uma forma patogênica de piroplasmídeo em gatos domésticos que apresentavam temperaturas elevadas e sintomas de “febre biliar”. Os parasitas foram considerados indistinguíveis da *B. felis* descrita por DAVIS em todos os aspectos morfológicos, incluindo a presença de tétrades. Concordando com CARPANO (1934), esses autores classificaram o parasita encontrado como *Nuttallia felis*; entretanto, como o parasita foi encontrado em gato doméstico e com uma patogenicidade marcante, o nome '*Nuttallia felis* var. *domestica*' foi adaptado para ele. Vale ressaltar que os gêneros *Babesiella* e *Nuttallia* não são reconhecidos como válidos e foram incluídos no gênero *Babesia* (WENYON, 1926).

Em 1937, McNEIL, também na África do Sul, e MANGRULKAR, no norte da Índia, publicaram seus achados sobre piroplasmose em gatos domésticos. Este autor tinha a opinião de que os parasitas encontrados por ele não apresentavam conformidade com aqueles descritos até então, mas, por não dispor de dados

suficientes e de estudo mais aprofundado, decidiu por não classificá-lo como uma nova espécie. A classificação ocorreu na Índia em 1950, quando MUDALIAR *et al.* encontraram em um gato selvagem indiano (*Felis catus*) organismos semelhantes aos relatados por MANGRULKAR e tiveram a oportunidade de estudá-los mais detalhadamente. Foi então proposta por eles uma nova espécie de *Babesia*: *Babesia cati* n. sp. Mudaliar, Achary e Alwar, 1946.

SHORTT (1940) publicou a primeira descrição de uma pequena *Babesia* encontrada no esfregaço sangüíneo de um leopardo (*Panthera pardus fusca*) na Índia, porém não atribuiu nenhum nome ao parasita. Vinte e cinco anos depois, BROCKLESBY *et al.* (1965), no Kenya, isolaram uma pequena e uma grande *Babesia* (*B. pantherae*) de um leopardo. Os parasitas foram inoculados em gatos domésticos esplenectomizados e posteriormente foram investigadas suas características através de microscopia eletrônica (DENNIG & HEBEL, 1969).

Uma grande *Babesia*, *B. herpailuri*, foi isolada de um jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*) originário da América do Sul. O estudo desse novo parasita foi relatado em diversas publicações (DENNIG, 1967a; DENNIG, 1967b; DENNIG, 1967c; DENNIG, 1969; DENNIG & HEBEL, 1969; DENNIG & HEBEL, 1970). A investigação do parasita consistiu de suas características morfológicas, patogênese, especificidade do hospedeiro e quimioterapia.

Não existem relatos de infecção natural por *B. pantherae* em gatos; no entanto, DENNIG & BROCKLESBY (1972) e LEGER *et al.* (1992) através de seus estudos com leopardos (*Panthera pardus*) afirmaram ser possível a infecção experimental dessa espécie de *Babesia* em gatos domésticos.

PENZHORN *et al.* (2001), baseando-se em estudos envolvendo biologia molecular, descreveram uma nova espécie de um pequeno piroplasmídeo encontrado em leões (*Panthera leo*): *Babesia leo* n. sp.

Em recente estudo no Reino Unido e Portugal, utilizando-se técnicas moleculares, foi identificada *B. canis* no sangue de dois gatos com doença clínica (BANETH *et al.*, 2004). Esse piroplasmídeo nunca havia sido descrito como um parasita de felídeos e os autores, baseados em diferenças morfológicas, sugeriram a criação de uma nova subespécie: *B. canis* subsp. *presentii*. Esses

achados demonstram haver uma maior diversidade de piroplasmas em felinos do que havia sido estabelecido anteriormente.

Casos esporádicos de infecção em gatos domésticos por espécies não identificadas de *Babesia* foram descritos na França, Alemanha, Tailândia e Zimbábwe (BANETH *et al.*, 2004).

BOSMAN *et al.* (2006) estudaram 27 gatos domésticos na África do Sul e conseguiram identificar três espécies de *Babesia* parasitando esses animais: *B. felis*, *B. leo* e *Babesia* sp..

No Brasil, são poucos os relatos de babesiose felina e ainda não se caracterizou a espécie observada em gatos doentes (O'DWYER & MASSARD, 2002). Hemoparasitas semelhantes à *B. felis* foram detectados em esfregaços sangüíneos em gatos domésticos no Rio de Janeiro (SOUZA, 2002; GAZETA *et al.*, 2004); entretanto, os autores não caracterizaram a espécie. MENDES-DE-ALMEIDA *et al.* (2004) observaram piroplasmídeos em 47% dos gatos de rua examinados. Porém, os autores não puderam distinguir *Babesia* spp. de *Cytauxzoon felis*. PICHOTANO *et al.* (2004) descreveram, baseando-se apenas em sua característica morfológica, o achado de *Cytauxzoon* em um gato doméstico no interior de São Paulo. Contudo, é provável que o parasito encontrado fosse *Babesia*, visto que os pequenos piroplasmídeos são muito semelhantes entre si.

2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

A babesiose de gatos domésticos tem sido descrita esporadicamente em vários países, incluindo França (LEGER *et al.*, 1992; BOURDEAU, 1996), Alemanha (MOIK & GOTHE, 1997), Tailândia (JITTAPALAPONG & JANSAWAN, 1993), Índia (MUDALIAR *et al.*, 1950), Zimbábwe (STEWART *et al.*, 1980) e Israel (BANETH *et al.*, 2004); porém, não causa doença clínica significativa em nenhum país além da África do Sul, onde é relatada a maior ocorrência nas regiões costeiras ou também, casos esporádicos em áreas não endêmicas, quando

animais retornam as suas casas depois de feriados nas regiões litorâneas (JACOBSON *et al.*, 2000).

Embora a babesiose possa afetar potencialmente gatos de qualquer idade, no entanto, a maioria dos relatos de felinos naturalmente infectados envolvem adultos jovens com menos de três anos. (SCHOEMAN, 2005). FUTTER & BELONJE (1980b) acreditam que *B. felis* é endêmica em certas áreas e que muitos gatos podem estar susceptíveis à doença enquanto filhotes e que posteriormente desenvolvem uma imunidade, tornando-se portadores assintomáticos do parasita. Quando *B. felis* é encontrada em gatos mais velhos, doenças concomitantes também são geralmente observadas. Em cães infectados por *B. canis*, já foi demonstrado que um estado pré-imune ocorre e que, sob certas condições, como uma doença ou trauma severo, há uma diminuição dessa imunidade e a babesiose pode se manifestar clinicamente. A mesma situação pode ocorrer com gatos, que se tornariam portadores subclínicos do parasita após uma infecção inicial. Quando gatos são transferidos de uma área onde a *B. felis* não ocorre para uma área endêmica, eles geralmente tornam-se infectados (FUTTER & BELONJE, 1980b).

Não há predileção quanto ao sexo, mas, em relação à raça, os gatos siameses parecem ser mais acometidos do que os animais de outras raças ou aqueles sem raça definida, nos quais a doença tem sido relatada apenas esporadicamente (SCHOEMAN *et al.*, 2001; PENZHORN *et al.*, 2004).

2.1.3. CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O ciclo evolutivo dos parasitas envolvidos na babesiose felina ainda não está completamente elucidado. Apesar de ser supostamente uma infecção transmitida por carrapatos, o vetor e reservatórios envolvidos ainda não foram identificados, sugerindo que estudos mais aprofundados envolvendo transmissão são necessários para melhor elucidar tanto a susceptibilidade quanto a forma de infecção desse parasita (BOURDEAU, 1996; MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004; PENZHORN *et al.*, 2004). Apesar disso, é provável que a biologia seja semelhante

aos descritos para outras espécies de *Babesia* de diversos animais. Primeiramente, o animal se infectaria por intermédio da picada de um carrapato, através de sua saliva. Os parasitas se desenvolveriam e se proliferariam no interior das hemácias, resultando na parasitemia detectável em esfregaços sangüíneos. Continuando o ciclo, os novos carrapatos se infectariam através da alimentação nos animais com parasitemia ou naqueles com infecção latente. No interior do carrapato, somente as formas sexuadas do parasita sobreviveriam; os trofozoítos dentro das hemácias são destruídos e os gametócitos continuam o ciclo. Após a fecundação, produzem os esporocinetos, que são passíveis de disseminação por todos os tecidos do vetor. O parasita penetra nas glândulas salivares do carrapato e se desenvolve em esporozoítos. Havendo passagem do parasita ao estágio seguinte, nas fêmeas, os ovócitos podem também ser infectados, garantindo a passagem do parasita às gerações seguintes.

2.1.4. PATOGENIA E PATOGENICIDADE

A patogenia da babesiose felina é supostamente similar à da babesiose canina e envolve danos aos eritrócitos induzidos pelos parasitas, com subsequente anemia hemolítica. No entanto, a babesiose felina é considerada de baixa a moderada patogenicidade, sendo que os sinais clínicos são menos severos que em cães, uma vez que gatos raramente desenvolvem crises hemolíticas intravasculares (JACOBSON & CLARK, 1994; MOIK & GOTHE, 1997). Além disso, a patogenicidade depende da espécie ou subespécie de *Babesia* com qual o animal se infectou, mas, em geral, as pequenas babesias são as mais patogênicas. Muitos mecanismos patogênicos estão mais relacionados com a resposta imune do hospedeiro contra o agente do que resultante de uma destruição direta do eritrócito pelo parasita (TABOADA & MERCHANT, 1991; BOURDEAU, 1996). Acredita-se que, com exceção da *B. felis* encontrada na África do Sul, as espécies de *Babesia* encontradas nesses animais sejam relativamente pouco patogênicas e que tenham uma tendência a cronicidade (BANETH *et al.*, 2004).

2.1.5. SINAIS CLÍNICOS

O quadro clínico da babesiose é determinado pela espécie ou subespécie de *Babesia*, pela resposta imune e idade do hospedeiro, pela presença de infecções concomitantes e exposição prévia ao agente (BOOZER & MACINTIRE, 2003). Diferentemente da babesiose em outros animais, a babesiose felina não está necessariamente associada à elevação de temperatura. Assim como a febre, a icterícia raramente é observada e a maioria dos sinais clínicos está relacionada à intensidade da anemia e incluem anorexia, letargia, fraqueza, palidez de mucosas, taquicardia e taquipnéia. Co-infecções de *Babesia* com os vírus da Imunodeficiência Felina, Leucemia Felina e Peritonite Infecciosa Felina; *Mycoplasma haemofelis* e vírus respiratórios são descritas e devem ser consideradas ao analisar os sinais clínicos nesses animais (JACOBSON *et al.*, 2000).

A sintomatologia associada à babesiose felina causada por *B. felis*, sob condições experimentais, é discreta e pouco característica, podendo se agravar em situações de stress. O período pré-patente da infecção por *B. felis* é de um a dois dias e os sinais clínicos incluem apatia, letargia, prostração, anorexia acompanhada por emagrecimento, pelagem opaca, hipertermia inconstante, mucosas pálidas e raramente ictericas e distúrbios digestivos inconstantes. A doença segue tendendo à cronicidade e os sinais clínicos geralmente passam despercebidos até que a doença chegue a uma fase avançada, que quando não tratada pode induzir ao óbito do animal (FUTTER & BELONJE, 1980b; BOURDEAU, 1996; SCHOEMAN *et al.*, 2001).

2.1.6. DIAGNÓSTICO

2.1.6.1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1.6.1.1. Exame de esfregaço sangüíneo

O diagnóstico da babesiose felina é baseado na identificação morfológica dos parasitas intraeritrocitários através de esfregaços de sangue periférico ou aspirados de medula óssea, linfonodos e baço, em combinação com os sinais clínicos compatíveis (SHAW *et al.*, 2001). Sendo os parasitos pequenos, a visualização com a coloração de Giemsa 10%, apesar de mais demorada, é mais indicada do que as colorações rápidas rotineiramente utilizadas em laboratório clínico veterinário (FUTTER & BELONJE, 1980).

O exame microscópico de sangue não é uma técnica diagnóstica muito eficiente nos estágios pós-infecção e crônicos da doença, quando a parasitemia é baixa ou até mesmo ausente, tornando-se necessária a inspeção de um número maior de amostras colhidas em maior período de tempo (LOPES, 2006). De acordo com SCHOEMAN *et al.* (2001), há uma forte correlação entre a parasitemia periférica e central, indicando que, o seqüestro pelos capilares, de eritrócitos parasitados, não é uma característica da babesiose felina, como normalmente acontece nos casos de babesiose em outras espécies animais.

Sendo assim, apesar de ser o método clássico de diagnóstico, é um método limitado devido a sua baixa sensibilidade e mais, não pode ser usado para estabelecer o genótipo de qualquer piroplasma, pois torna-se difícil a distinção morfológica entre as linhagens e espécies similares, como, por exemplo, a diferenciação entre *B. felis* e *C. felis* (UILENBERG *et al.*, 1989). Além disso, a diferenciação entre outros parasitas, como *M. haemofelis*, precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly e ponteados basofílios pode ser problemática, visto que todos podem demonstrar aparência muito semelhante (SCHOEMAN *et al.*, 2001).

2.1.6.1.2. Hematologia e Bioquímica Sérica

A alteração hematológica mais significativa em gatos com babesiose é uma anemia macrocítica e hipocrômica regenerativa, apesar de, interessantemente, nem todos os gatos afetados apresentarem anemia (JACKSON & DUNNING, 1937; FUTTER *et al.*, 1980; SCHOEMAN, 2005). A anemia pode se tornar muito severa em casos avançados da doença e sinais de regeneração são geralmente evidentes ao exame do esfregaço sangüíneo. O aumento absoluto na contagem de reticulócitos indica uma reposta ativa da medula óssea e que a causa da anemia provavelmente é de origem extramedular; nesse caso implicando tanto em hemólise intra quanto extravascular (fagocitose). A anemia da babesiose pode ser classificada como uma anemia hemolítica, causada pela destruição acelerada de eritrócitos. Essa destruição provavelmente acontece tanto intra quanto extravascular na babesiose felina (TABOADA, 1998).

De acordo com FUTTER *et al.* (1980); SCHOEMAN *et al.* (2001) e PENZHORN *et al.* (2004), as anormalidades do leucograma não são achados consistentes da babesiose felina, sugerindo que as alterações encontradas nesses animais poderiam ser resultado de problemas concorrentes ou outras doenças que não a babesiose.

A trombocitopenia é uma característica consistente da babesiose canina, porém, SCHOEMAN (2005) observou que esta não é freqüente nos casos de babesiose felina.

A alteração bioquímica mais evidente é o aumento da atividade das enzimas hepáticas de citosol e das concentrações totais de bilirrubina. A elevação significativa da alanina aminotransferase (ALT) está presente na maioria dos casos, evidenciando injúria hepatocelular primária ou inflamação. A fosfatase alcalina (FA) e a gama glutamiltransferase (GGT) estão geralmente dentro dos valores normais. A hiperbilirrubinemia provavelmente é resultante da hemólise, mas injúria hepatocelular secundária é provavelmente um fator contribuinte adicional. Uma hiperglobulinemia e gamopatia policlonal é bastante freqüente e pode ser atribuída a uma combinação de proteínas de fase aguda e crônica,

produzidas em resposta aos antígenos da *Babesia* (FUTTER *et al.*, 1981; SCHOEMAN *et al.*, 2001; PENZHORN *et al.*, 2004).

2.1.6.1.3. Sorologia

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi descrito para a detecção de anticorpos específicos contra *Babesia felis* (LOPEZ-REBOLLAR *et al.*, 1999). Na ocasião, os autores detectaram um pequeno piroplasmídeo em leões, morfológicamente similar a *B. felis* e *C. felis*, porém antigenicamente distinto, o que os fez sugerirem uma nova espécie. O uso da sorologia pode auxiliar no diagnóstico de gatos com infecção crônica ou com baixa parasitemia, nos quais são difíceis de detectar o protozoário pelo esfregaço sangüíneo.

2.1.6.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A investigação e identificação desses parasitas através de técnicas moleculares como a PCR e o seqüenciamento pode ser utilizadas como um método alternativo, visto que o diagnóstico baseado apenas nas características morfológicas é difícil e de baixa sensibilidade. Apesar de mais oneroso e de necessitar de profissionais qualificados e equipamentos diferenciados, a PCR é uma técnica altamente sensível e possui alta especificidade. O diagnóstico molecular de *Babesia* já vem sendo utilizado em pesquisas com gatos domésticos e tem demonstrado que a especificidade do piroplasmídeo aos hospedeiros é muito menor do que se pensava anteriormente e que somente o uso de técnicas específicas de diagnóstico pode caracterizar com precisão as espécies. A utilização da PCR e do seqüenciamento de seus produtos têm permitido aos pesquisadores identificar novas espécies, novas áreas endêmicas para antigas espécies e, inclusive, espécies em hospedeiros não usuais, como por exemplo, *Babesia canis canis* e *Babesia canis* subsp. *presentii* em gatos domésticos (PENZHORN *et al.*, 2001; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; BANETH *et al.*, 2004).

A primeira caracterização molecular de piroplasmas de felinos ocorreu em 2001, quando PENZHORN *et al.* realizaram a análise filogenética de piroplasmídeos isolados de leões, de um lince e de um gato doméstico na África do Sul. A reação de PCR foi realizada utilizando os primers previamente descritos por MARSH *et al.* (1995). O seqüenciamento e a análise filogenética foram conduzidos segundo KJEMTRUP *et al.* (2000). Através desse estudo, baseado na análise filogenética do gene 18S rRNA, foi possível a identificação de *Babesia leo*, uma espécie distinta de *B. felis* e de outros pequenos piroplasmídeos de felídeos, morfologicamente indistinguíveis entre si. As seqüências resultantes para *B. leo*, *B. felis* e os isolados do lince (tipo A e tipo B) estão disponíveis no GenBank, com os números de acesso AF244911, AF244912, AF244913 e AF244914, respectivamente. Além dessas seqüências obtidas de leões, do lince e isolados de *B. felis*, foram incluídas na análise filogenética para comparação as seqüências dos produtos da PCR de *Theileria* spp., *Babesia* spp., *Cytauxzoon felis* e piroplasmas oriundos dos Estados Unidos. Essas seqüências foram incluídas na análise devido à suas altas percentagens de similaridade genotípica com os isolados felinos ou por já terem sido previamente documentados nesses animais.

CRIADO FORNELIO *et al.* (2003a) demonstraram que o uso da PCR como instrumento diagnóstico pode revelar infecções por piroplasmídeos em hospedeiros não usuais, como o encontro de *Theileria annae* e *B. canis canis*, parasitas de cães, em felinos. Os autores estudaram a presença de piroplasmídeos em 16 gatos provenientes da Espanha e Portugal através de seminested RFLP-PCR. Reações de PCR específicas para os gêneros *Babesia* e *Theileria* foram realizadas utilizando seqüências para diversos piroplasmídeos de mamíferos: *Babesia canis* (L-19079), *B. felis* (AF-244912), *B. leo* (AF-244911), *B. equi* (Z-15015), *B. caballii* (Z-151049), *Theileria annae* (AF-188001), *T. annulata* (M-64243), *Cytauxzoon felis* (L-19080), dentre outros. O seqüenciamento parcial da porção 18S do rRNA possibilitou a identificação de dois gatos infectados por *B. canis canis*, um gato infectado com *T. annae* e um gato infectado com ambos piroplasmídeos. As seqüências dos isolados de *B. canis* e *T. annae* dos gatos

foram submetidos ao GenBank com os números de acesso AY15057 e AY150068 e foram 100% idênticas aos isolados encontrados em cães.

Em recente estudo no Reino Unido e Israel, foi identificada *B. canis* no sangue de dois gatos com doença clínica, utilizando-se caracterização morfológica e amplificação e seqüenciamento do gene 18S rRNA, seguidos por análise filogenética (BANETH *et al.*, 2004). A PCR do sangue total foi realizada utilizando os primers BabgenF e BabgenR, específicos para o gene 18S rRNA, que amplificaram uma seqüência de 270 pb. O seqüenciamento demonstrou 99,4% de identidade com *B. canis*. Diante dos resultados obtidos e baseando-se em diferenças morfológicas, os autores sugeriram a criação de uma nova subespécie, denominada *B. canis* subsp. *presentii*.

Através da técnica de hibridização RLB (“Reverse line blot”), BOSMAN *et al.* (2006) conseguiram detectar várias espécies de *Babesia* em diversos felinos e realizar a diferenciação entre elas. Esses autores demonstraram que *B. leo* e *B. felis* ocorrem tanto como infecções únicas como concomitantes em várias espécies de felinos, mas mais frequentemente em leões e gatos domésticos, respectivamente. Dos 27 gatos domésticos estudados, 14 estavam infectados, sendo que oito desses animais foram positivos somente para *B. felis*, cinco positivos somente para *Babesia* sp. e um apresentava infecção mista, sendo positivo tanto para *B. felis* como para *B. leo*.

2.2. Hepatozoon spp. em gatos

2.2.1. HISTÓRICO E ETIOLOGIA

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa e Classe Sporozoa que infectam uma grande variedade de carnívoros domésticos e selvagens, incluindo canídeos e felídeos. A maioria das espécies do gênero *Hepatozoon* que infectam mamíferos produz gametócitos que podem ser visualizados em leucócitos do sangue periférico (BANETH *et al.*, 1998).

Esse parasita já foi descrito em muitas espécies de felinos selvagens, como lince (*Lynx rufus*) (LANE & KOCAN, 1983 e MERCER *et al.*, 1988); jaguatirica (*Felis pardalis*) (MERCER *et al.*, 1988); gato-de-pallas ou manul (*Otocolobus manul*) (BARR *et al.*, 1993); leões (*Panthera leo*), guepardos (*Acinonyx jubatus*), leopardos (*Panthera pardus*) (BROCKLESBY & VIDLER, 1963; McCULLY *et al.*, 1975 e AVERBECK *et al.*, 1990) e gatos selvagens japoneses (*Felis iriomotensis* e *Felis bengalensis euphilura*) (KUBO *et al.*, 2006).

A infecção por *Hepatozoon sp.* em gatos domésticos foi primeiramente relatada na Índia no início do século 20 (PATTON, 1908). Esse autor descreveu o parasita no sangue periférico, notavelmente no interior de leucócitos polimorfonucleares, onde, em sua opinião, apresentava características morfológicas idênticas às de *Hepatozoon canis*, descrito por BENTLEY (1905) em cães. Nessa ocasião, PATTON denominou o parasita de *Hepatozoon felis domesticus*, alegando a ausência da cápsula que é observada na espécie *H. canis*. WENYON (1926) e, mais tarde, BATHIA (1938) consideraram esse critério inadequado, pois detectaram a cápsula que PATTON (1908) falhou em observar. Desde então, existem poucos relatos do parasita nesse hospedeiro. A infecção por *Hepatozoon spp.* em gatos foi descrita na África (LEEFLANG & ILEMOBADE, 1977 e VAN AMSTEL, 1979), Israel (KLOPFER *et al.*, 1973, BANETH & SHKAP, 1995 e BANETH *et al.*, 1998), Estados Unidos (EWING, 1977), Espanha (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2006), Tailândia (JITTAPALAPONG *et al.*, 2006) e Japão (KUBO *et al.*, 2006). No Brasil, SOARES *et al.* (1999) descreveram a

ocorrência de *Hepatozoon felis* em gato-do-mato (*Felis tigrina*), baseados apenas nas características morfológicas e, recentemente, PEREZ *et al.* (2004) descreveram o primeiro relato de *Hepatozoon sp.* em gatos domésticos, acometendo três animais naturalmente infectados no Estado de São Paulo.

A infecção é bem conhecida em cães, no qual duas espécies são descritas, *H. canis* e *H. americanum* (VINCENT-JOHNSON *et al.*, 1997). No entanto, em gatos esse protozoário é pouco estudado. Ainda existem dúvidas sobre a espécie de *Hepatozoon* que acomete gatos, já que PATTON (1908) descreveu *H. felis*, enquanto WENYON (1926) e PEREZ *et al.* (2004) consideraram que a espécie felina é morfológicamente idêntica a *H. canis*, dificultando a diferenciação entre elas. RUBINI *et al.* (2006), por meio de técnicas moleculares e seqüenciamento parcial do gene 18S rRNA, confirmaram que a espécie de *Hepatozoon* diagnosticada em gatos, no Brasil, tem alta identidade com a espécie encontrada em cães, que foi identificada como sendo *H. canis*. Por outro lado, BEAUFILS *et al.* (1998) e BEAUFILS (2004), na França, observaram gametócitos de *Hepatozoon sp.* com características morfológicas distintas dos gametócitos de *H. canis*, sugerindo que possa existir uma outra espécie infectando gatos domésticos. Os gametócitos possuíam formato de feijão, cápsula pouco visível e com citoplasma mais granuloso.

2.2.2. EPIDEMIOLOGIA

Segundo BANETH *et al.* (1998), a maioria dos gatos infectados por *Hepatozoon spp.* é de machos, com dois anos de idade ou mais jovens. Diversas explicações já foram propostas para essa desproporcionalidade na taxa de infecção por *Hepatozoon* entre machos e fêmeas. Gatos machos, que têm livre acesso à rua, poderiam estar mais expostos ao vetor do que as fêmeas, que tendem a ficar no interior de suas casas. Sabe-se que, por terem livre acesso à rua e estarem comumente participando de brigas territoriais, estão mais predispostos à infecção por um agente imunossupressor, como os vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Leucemia Felina (FELV), os quais podem torná-los

mais suscetíveis à infecção por *Hepatozoon* (BANETH *et al.*, 1998). A idade inferior a dois anos dos gatos infectados poderia estar relacionada à curta vida dos gatos acometidos por doenças imunossupressoras, como as infecções retrovirais, ou devido à possibilidade de mortalidade induzida diretamente pelo *Hepatozoon*, talvez por insuficiência cardíaca (BANETH *et al.*, 1998).

2.2.3. CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

A especificidade do hospedeiro para as espécies do gênero ainda é desconhecida e diferenças morfológicas significantes entre esquizontes de *Hepatozoon* encontrados em tecidos de carnívoros selvagens e de cães ainda não foram demonstradas (BANETH *et al.*, 1998).

Em cães, a infecção ocorre através da ingestão do hospedeiro invertebrado hematófago, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, contendo oocistos com esporozoítos maduros na sua hemocele. Presume-se que os gatos se infectem da mesma forma (SHAW *et al.*, 2001). Quando o animal ingere o artrópode, os esporozoítos são liberados dos oocistos e penetram na parede intestinal, sendo disseminados por via sangüínea e circulação linfática até o baço, linfonodos, fígado, medula óssea, pulmões e músculos esqueléticos e cardíacos. Nesses locais, multiplicam-se através de esquizogonia, formando dois tipos distintos de esquizontes: um contendo macromerozoítos e outro, micromerozoítos. Os micromerozoítos são liberados dos esquizontes e penetram nos leucócitos, onde darão origem aos gamontes ou gametócitos. Os macromerozoítos continuam o ciclo esquizogônico. Quando o carrapato se alimenta do sangue de cães contendo os gametócitos no interior de leucócitos, ocorre a fusão dos gametas no tubo digestivo do vetor, com a posterior formação do oocineto. Esse, como tem motilidade, atravessa a parede intestinal, caindo na hemocele, onde se desenvolve chegando a oocisto. O oocisto, quando maduro, passa a apresentar de 30 a 50 esporocistos, cada um contendo cerca de 16 esporozoítos. Esse oocisto permanece na hemocele do carrapato e não há migração de esporozoítos para a glândula salivar (BANETH & SHKAP, 1995).

2.2.4. PATOGENIA E PATOGENICIDADE

Apesar dos diversos estudos sobre esse parasita em cães, ainda ocorrem divergências quanto à sua patogenicidade. Para alguns autores, *H. canis* é um protozoário oportunista e, cães que apresentam sinais clínicos estão infectados por outros agentes (MCCULLY *et al.*, 1975). Entretanto, a infecção concomitante com diferentes parasitas pode produzir um quadro clínico mais grave do que quando o parasitismo ocorre isoladamente (GOSSET *et al.*, 1985). BANETH & WEIGLER (1997) observaram uma relação entre o grau de parasitemia e o aparecimento de sintomas.

BANETH *et al.* (1998) acreditam que *Hepatozoon* sp. seja um parasita oportunista que infectaria mais facilmente gatos imunossuprimidos, ou poderia persistir como infecção latente nos tecidos de gatos aparentemente saudáveis e ser “reativado” sob condições de imunossupressão ou stress. A infecção por *Hepatozoon* em cães, por ser mais comumente diagnosticada do que em gatos, pode ser útil para um maior entendimento sobre a patogênese do parasita nesses animais. O desenvolvimento da hepatozoonose em cães parece estar associado à condição imune do hospedeiro. A infecção por *H. canis* poderia desencadear diversas condições como, por exemplo, uma alteração genômica nos neutrófilos; uma subsequente imunossupressão e, conseqüentemente, o estabelecimento de infecções com outros agentes infecciosos.

Os eventuais sinais clínicos observados em gatos portadores geralmente são atribuídos a outros agentes infecciosos; principalmente virais, como FIV e FELV, ou bacterianos, como *Mycoplasma haemofelis* (BANETH *et al.*, 1998).

Dessa forma, parece que a hepatozoonose, tanto no gato como no cão, freqüentemente desenvolve-se em associação a uma imunodeficiência induzida por uma doença concomitante. Com isso, é sempre sugerida a investigação de uma doença concomitante quando a hepatozoonose é diagnosticada nos gatos.

KUBO *et al.* (2006), baseados em seus estudos histopatológicos, sugerem que a patogenicidade de *Hepatozoon* sp. em gatos seja baixa e que esse parasita provavelmente não seja um importante patógeno em animais saudáveis.

2.2.5. SINAIS CLÍNICOS

Uma grande variedade de sinais clínicos é relatada, por diferentes autores, em gatos com infecção por *Hepatozoon*. Todos os sinais sugerem que a maioria das anormalidades encontradas pode ser atribuída a outras doenças concomitantes, assim como a insuficiência renal, intoxicações, hemobartonelose, FIV e FELV (BANETH *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2004). O pequeno número de casos de infecção registrados, o amplo espectro de manifestações clínicas e a presença de infecções concomitantes fazem supor ser difícil estabelecer uma possível associação entre a presença do parasita e sinais clínicos característicos da infecção. Nas descrições prévias de infecção por *Hepatozoon* em gatos, os sinais clínicos descritos incluíram patologias de diversos órgãos e tecidos, como cavidade oral, rins e fígado (BANETH & SHKAP, 1995; BANETH *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2004).

EWING (1977), durante a necrópsia de uma gata com diagnóstico de leucemia monocítica, encontrou diversos protozoários unicelulares, em formato de charuto, no fígado desse animal e os identificou como *Hepatozoon* sp. Os sinais clínicos descritos eram anorexia intermitente, perda de peso progressiva, glossite ulcerativa, pirexia, descarga ocular e nasal, anemia, emaciação e desidratação.

Em 1979, VAN AMSTEL descreveu letargia, anorexia, estomatite, gengivite e pirexia em um gato com gametócitos de *Hepatozoon*. BANETH & SHKAP (1995) relataram o encontro de um gato com parasitemia por *Hepatozoon* que apresentava sinais de fraqueza, hipersalivação, halitose, úlceras na língua, gengivite, linfadenopatia e normotermia.

BANETH *et al.* (1998) realizaram estudo retrospectivo com 1229 gatos com hepatozoonose em um período de sete anos. Os gatos infectados apresentavam grande variedade de sinais clínicos, desde normotermia, hipotermia e até mesmo febre. Linfadenopatia, anorexia, vômito, halitose, letargia, alopecia, desidratação, incontinência urinária, úlceras e dispnéia foram outros sinais encontrados, porém sem associação com a infecção por *Hepatozoon*.

PEREZ *et al.* (2004) relataram o primeiro caso de *Hepatozoon* sp. acometendo gatos domésticos no Brasil. Nesse estudo, três gatos apresentavam gamontes no interior dos leucócitos, entretanto, apenas um animal apresentava sinais clínicos de doença, os quais não foram atribuídos à infecção por *Hepatozoon* e sim, a uma insuficiência renal aguda.

2.2.6. DIAGNÓSTICO

2.2.6.1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.2.6.1.1. Exames de esfregaço sangüíneo

Rotineiramente, a infecção por *Hepatozoon* spp. é diagnosticada pela detecção microscópica de gametócitos no interior de leucócitos, durante o exame de esfregaços sangüíneos corados por Giemsa. Contudo, a análise morfológica dos gametócitos não possibilita a diferenciação das espécies de *Hepatozoon* existentes, pois a morfologia pode apresentar-se variável de acordo com a espécie animal infectada e também de acordo com a espécie de *Hepatozoon* encontrada (WANER *et al.*, 1994).

Segundo PEREZ *et al.* (2004), o único relato do parasita em gatos doméstico no Brasil revelou que os gametócitos mediam $9.88 \pm 0.39 \mu\text{m}$ de comprimento, $5.3 \pm 0.19 \mu\text{m}$ de largura e $45.85 \pm 4.9 \mu\text{m}$ de área. Essas medidas são compatíveis com os gametócitos de *H. canis* encontrados por BANETH & SHKAP (1995) ($11 \mu\text{m} \times 4.5 \mu\text{m}$). As medidas encontradas por PEREZ *et al.* são muito similares às encontradas por ALENCAR *et al.* (1997) para *Hepatozoon* em raposas (*Cerdocyon thous*) no Brasil ($9.1 \pm 0.54 \times 5.3 \pm 0.46 \mu\text{m}$), ligeiramente menores do que as medidas ($11.42 \times 5.39 \mu\text{m}$ e $45.88 \mu\text{m}$ de área) encontradas em cães por WANER *et al.* (1994) e maiores do que os gametócitos estudados por LANE & KOCAN (1983) observados em lincos ($11.0 \times 2.5 \mu\text{m}$).

Essa não é uma técnica diagnóstica muito sensível, visto que a parasitemia por *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos geralmente é muito baixa e

a visualização dos gametócitos no interior de leucócitos é rara nesses animais (BANETH & SHKAP, 1995 e BANETH *et al.*, 1998). Tal fato pôde ser comprovado por BANETH *et al.* (1998), que examinaram esfregaços sangüíneos de 1229 gatos e identificaram gametócitos de *Hepatozoon* em somente sete animais, compreendendo apenas 0,57% do número total de gatos analisados. Além disso, JITTAPALAPONG *et al.* (2006), em seu estudo com 300 gatos, demonstraram a baixa sensibilidade do esfregaço sangüíneo no diagnóstico de *Hepatozoon*, pois diagnosticaram apenas dois (0,66%) animais por esse método e 97 (32,3%) positivos para *Hepatozoon* através da técnica de PCR.

2.2.6.1.2. Histologia

Outra forma de diagnóstico é através da detecção dos estágios do parasita em cortes histológicos de vários órgãos, como fígado, medula óssea, baço e pulmões. Merontes maduros de *Hepatozoon* contém merozoítos alongados arranjados em círculo ao redor de um núcleo central claro (BANETH *et al.*, 2003).

KLOPFER *et al.* (1973) descreveram o encontro de esquizontes “*Hepatozoon-like*” em músculo cardíaco de um gato doméstico. Os esquizontes estavam localizados nos capilares do miocárdio e eram morfológicamente idênticos aos esquizontes de *H. canis* observados em linfonodos, baço e fígado de cães infectados. Em 1977, EWING relatou o achado de esquizontes semelhantes aos de *H. canis* em imprints de fígado de um gato doméstico. BEUFILS *et al.* (1998) observaram numerosos esquizontes no miocárdio e músculo esquelético, e ausentes em fígado, baço e pulmão. Estes esquizontes, semelhantes aos que são encontrados em cães, não estavam associados à resposta inflamatória. Recentemente, KUBO *et al.* (2006) descreveram a presença de esquizontes de *Hepatozoon* sp. em músculo cardíaco, língua, masseter e diafragma de 23 felinos selvagens japoneses e a presença de reações inflamatórias contra o parasita nos órgãos desses animais. Os autores não encontraram gametócitos em leucócitos circulantes do sangue periférico, apesar do achado de outras formas parasitando esses animais.

2.2.6.1.3. Hematologia

EWING (1977), ao avaliar os resultados do hemograma de uma gata siamesa com diagnóstico de leucemia monocítica e colangiohepatite granulomatosa por *Hepatozoon sp.*, observou marcada anemia macrocítica hipocrômica com tendência arregenerativa. A contagem de leucócitos totais nesse animal apresentou-se bastante elevada, com neutrofilia com leve desvio à esquerda e intensa monocitose com presença de células atípicas, sugestivas de monoblastos. Deve-se salientar que, tais achados laboratoriais devem ser cuidadosamente analisados, pois não foram excluídas outras patologias que poderiam estar associadas ao parasitismo por *Hepatozoon sp.* A completa contagem sangüínea realizada por BANETH & SHKAP (1995), ao relatarem a parasitemia por *Hepatozoon sp.* em dois gatos domésticos, demonstrou valores dentro da normalidade para a espécie. Já a contagem diferencial feita manualmente revelou uma discreta linfopenia em ambos os casos, o que poderia estar associada a um possível estado de imunossupressão concomitante a infecção pelo parasita, o que é observado com freqüência em animais parasitados por *Hepatozoon spp.*

A fim de elucidar as características clinicopatológicas da hepatozoonose em gatos domésticos, um estudo retrospectivo foi realizado por BANETH *et al.* (1998) utilizando 1229 animais. A anemia encontrada por esses autores em dois dos sete gatos com parasitemia por *Hepatozoon sp.* é questionável, visto que os gatos estavam simultaneamente infectados por *Hemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*). Leucocitose por monocitose foi evidente no sangue de três gatos e trombocitopenia foi detectada em quatro gatos parasitados. Todos os animais parasitados também apresentavam outras infecções concomitantes.

No único relato do parasita em gatos domésticos no Brasil, PEREZ *et al.* (2004) observaram marcada anemia normocítica normocrômica, além de leucopenia com linfopenia em apenas um dos três gatos parasitados por *Hepatozoon sp.*. Os outros dois animais infectados apresentavam valores normais na contagem total celular, porém, na contagem diferencial de leucócitos,

revelaram uma discreta neutrofilia absoluta. No entanto, esses autores não atribuíram essas alterações à infecção por *Hepatozoon sp.*, visto que era evidente a presença de insuficiência renal aguda no primeiro animal, a qual poderia levar ao desenvolvimento das alterações citadas.

2.2.6.1.4. Bioquímica

As alterações bioquímicas mais consistentes, descritas na literatura em gatos domésticos infectados por *Hepatozoon sp.*, incluem níveis elevados das enzimas musculares creatinaquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) e da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) (BANETH & SHKAP, 1995; BANETH *et al.*, 1998 e PEREZ *et al.*, 2004). As atividades aumentadas das duas primeiras enzimas são sugestivas de lesão da musculatura esquelética ou miocárdica. A possibilidade de que o miocárdio seja a fonte dos níveis elevados de LDH e CK é sustentada pelos achados de KLOPFER *et al.* (1973), que descreveram uma forma de esquizonte *Hepatozoon-like* no lúmen de capilares sanguíneos do miocárdio de gatos, e por McCULLY *et al.* (1975) que relataram a presença de numerosos esquizontes no miocárdio de leões, leopardos e guepardos. A CK tem origem exclusiva nos músculos esqueléticos ou cardíacos, enquanto a LDH pode ser produzida tanto pelo tecido muscular quanto por outros tecidos, como por exemplo, fígado, rins ou pelos eritrócitos (RICH & COLES, 1995). PEREZ *et al.* (2004) observaram valores enzimáticos elevados mesmo em animais assintomáticos.

A atividade aumentada de enzimas hepáticas como ALT e fosfatase alcalina, como citada por BANETH *et al.* (1998) e PEREZ *et al.* (2004), é um achado comum em cães com hepatozoonose e poderia estar relacionada à presença dos estágios de desenvolvimento do parasita no fígado desses animais.

2.2.6.1.5. Sorologia

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi descrito para a detecção de anticorpos específicos contra gamontes de *H. canis* (SHKAP *et al.*, 1994 e BANETH *et al.*, 1998). No entanto, não existem relatos do diagnóstico de *Hepatozoon* em gatos através de técnicas sorológicas. O uso da sorologia poderia auxiliar no diagnóstico de gatos com infecção crônica ou com baixa parasitemia, nos quais são difíceis de detectar o protozoário pelo esfregaço sangüíneo.

2.2.6.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os primeiros estudos envolvendo *Hepatozoon* spp. e técnicas moleculares de diagnóstico foram realizados na década de 90 por WOZNIAK *et al.* (1994), que caracterizaram geneticamente e relacionaram espécies de *Hepatozoon* de serpentes. Somente no ano de 2000 iniciaram-se as pesquisas envolvendo a busca pelo DNA do parasita em cães (BANETH *et al.*). A partir de então, os estudos envolvendo esse parasita e seu diagnóstico por técnicas moleculares foram intensificados (MATHEW *et al.*, 2000; INOKUMA *et al.*, 2002; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003b, PALUDO *et al.*, 2005 e RUBINI *et al.*, 2005).

Até recentemente, a diferenciação entre espécies que acometem felinos era baseada apenas na morfologia. Contudo, já existem relatos de diagnóstico baseados em comparação de DNA a fim de verificar quais espécies acometem esses animais (RUBINI *et al.*, 2006).

A primeira descrição do diagnóstico de *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos através de técnicas de biologia molecular foi realizada no Brasil por RUBINI *et al.* (2006). Esses autores fizeram a caracterização molecular da espécie de *Hepatozoon* sp. encontrada no sangue periférico de três gatos naturalmente infectados no Estado de São Paulo por PEREZ *et al.* (2004). A seqüência de nucleotídeos revelou que os isolados brasileiros desses gatos eram estreitamente relacionados com os isolados brasileiros de cães, considerados uma variante de *H. canis* (RUBINI *et al.*, 2005). As seqüências de DNA de *Hepatozoon* de origem

felina diferiram das dos cães somente por um único sítio polimórfico e pela depleção de dois nucleotídeos. Essas diferenças nas seqüências ITS dos gatos e cães foram insuficientes para suportar a hipótese de serem espécies diferentes de *Hepatozoon*, indicando que a espécie que infectou os felinos, no Brasil, foi também *H. canis*, como foi sugerido por WENYON (1926), que considerou o parasita de gatos indistinguíveis de *H. canis* do cão, de chacais e hienas.

Estudos posteriores envolvendo o diagnóstico de *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos através de técnicas moleculares foram desenvolvidos na Tailândia (JITTAPALAPONG *et al.*, 2006) e na Espanha (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2006). Na Tailândia, os autores classificaram as seqüências obtidas como sendo de *H. canis*, enquanto na Espanha os autores classificaram os parasitas encontrados como *H. felis*, com 96% de identidade com *H. canis*. Esses resultados demonstram que é possível que mais de uma espécie de *Hepatozoon* possa parasitar gatos domésticos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Considerando:

A escassez de dados e a falta de conhecimento sobre os hemoparasitas que acometem gatos domésticos no Brasil,

Os recentes relatos inconclusivos sobre o assunto,

Que a infecção por *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. é amplamente distribuída nas regiões de clima tropical e cuja importância vem crescendo ao longo dos anos pelo aumento do número de casos diagnosticados,

O presente estudo teve como objetivo:

- Estudar a ocorrência de espécies de *Babesia* e de *Hepatozoon* em gatos domésticos, de áreas urbanas e rurais, no Estado de São Paulo e Distrito Federal, utilizando técnicas de esfregaços sangüíneos e PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais

Foram utilizados 144 gatos domésticos, sendo 113 provenientes do Estado de São Paulo e 31 oriundos do Distrito Federal. Os animais foram selecionados aleatoriamente e de acordo com a autorização de seus proprietários. A maioria dos animais habitava áreas rurais (52,8%) e, quando urbanas (47,2%), eram animais com livre acesso à rua (Figura 1). Não foram feitas distinções quanto à raça, idade, sexo ou estado de saúde desses animais. As amostras dos animais do Estado de São Paulo foram coletadas em diferentes cidades e municípios, sendo 54 provenientes da região de Botucatu, 20 de Vargem Grande do Sul, 18 de São João da Boa Vista, cinco de Piracicaba, um de São Paulo e 15 de Bofete. O restante dos animais era proveniente de diversas regiões do Distrito Federal: seis do Plano Piloto, 13 do Varjão, dois de São Sebastião, quatro de Sobradinho e seis do Gama. Os locais das coletas incluíam casas, chácaras, gatis de Associações Protetoras dos Animais, clínicas veterinárias com projeto de castração e doação de animais de rua, Centro de Controle de Zoonoses e animais abandonados na rua. As coletas foram realizadas durante o período de julho de 2004 a junho de 2005.

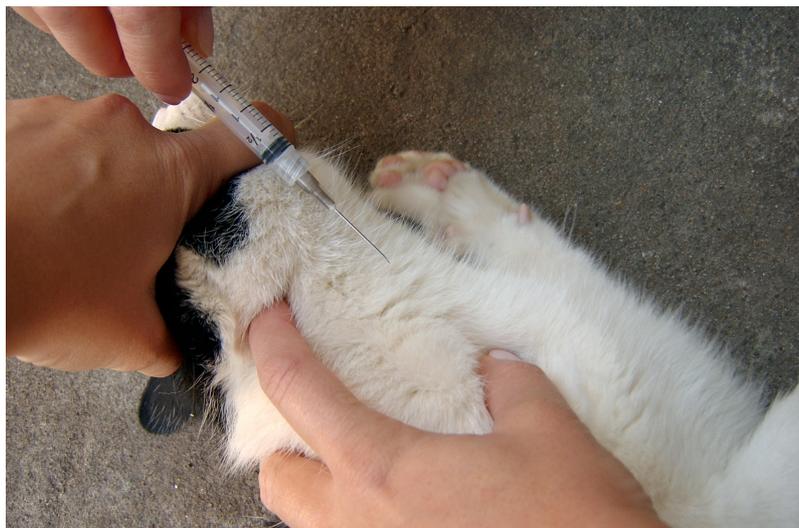


FIGURA 1. Coleta de sangue de gato doméstico por meio da punção da veia jugular

4.2. Coleta de sangue

O sangue foi coletado através da punção da veia jugular e armazenado em tubos “vacutainer” contendo EDTA 10%. Foram realizados esfregaços sangüíneos imediatamente após a coleta e, quando possível, amostras de sangue capilar, provenientes de vasos auriculares (ponta de orelha), foram obtidas com o auxílio de uma lanceta e esfregaços sangüíneos foram confeccionados.

4.3. Pesquisa de carrapatos

Todos os gatos foram examinados, especialmente na região das orelhas e coxins plantares e palmares, para detecção da presença de carrapatos.

4.4. Acondicionamento das amostras

Todas as amostras de sangue foram identificadas, acondicionadas em isopor contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu. Em seguida, um mL do sangue foi transferido para um eppendorf devidamente identificado e as amostras foram congeladas em freezer a – 20°C até posterior realização da extração do DNA e análise pela técnica da PCR.

4.5. Processamento das amostras

4.5.1. Esfregaços sangüíneos

Os esfregaços sangüíneos foram fixados por 5 minutos em metanol e corados com Giemsa (Merck, São Paulo, Brasil) a 10% durante 30 minutos e posteriormente examinados para a pesquisa de possíveis merozoítos de *Babesia* sp. e gametócitos de *Hepatozoon* sp. por microscopia óptica, utilizando objetiva com aumento de 100x. A observação sistemática desses esfregaços foi feita em aproximadamente 100 campos microscópicos (SOARES *et al.*, 2006).

4.5.2. Extração do DNA genômico

Os experimentos de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Unesp, campus de Botucatu, As amostras de sangue total tiveram seu DNA extraído em câmara de fluxo laminar utilizando-se o Kit comercial GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as recomendações do fabricante. O método escolhido foi o direto, porém com algumas modificações:

- O DNA das amostras foi obtido através da incubação prévia de 100 µl de sangue total com 25 µl de Proteinase K (digestão) por 4 horas a 70°C. Após essa etapa, o DNA foi isolado seguindo normalmente as recomendações do fabricante.

Cada amostra foi eluída em 100 µl de água “UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water” autoclavada e aquecida à 70°C. O DNA extraído foi armazenado a -20° até o momento da sua utilização para a PCR.

4.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.6.1. Obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores

O DNA obtido foi amplificado pela técnica de PCR, realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores internos específicos para cada gênero de protozoário. Para *Babesia* spp. foi seguido o protocolo descrito por JEFFERIES *et al.* (2003) e, para *Hepatozoon* spp., como descrito por INOKUMA *et al.* (2002).

Os oligonucleotídeos (Invitrogen®) foram adquiridos e diluídos a 100 pmol/µl com água Milli-Q autoclavada. A seguir, essa solução foi diluída, também em água Milli-Q autoclavada, em quantidade suficiente para obter a solução de uso, cuja concentração final foi de 10 pmol/µl.

4.6.2. Amplificação de seqüência genética de *Babesia* spp.

O DNA extraído de cada amostra foi testado inicialmente para a presença de seqüência genética das espécies do gênero *Babesia* utilizando-se os iniciadores Piro A1 *foward* (5'- AGG GAG CCT GAG AGA CGG CTA CC - 3') com 23 bases e Piro B *reverse* (5'- TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3') com 21 bases. As seqüências descritas por JEFFERIES *et al.* (2003) amplificaram um fragmento do gene codificador da subunidade 18S do RNA ribossomal, originando um produto de aproximadamente 450 pb (pares de base).

As reações de amplificação foram montadas em um volume total de 25 µl contendo 5 µl de DNA da amostra. A mistura de PCR foi composta de: 2,5 µl de tampão 10 x (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, Amersham Biosciences®), 0,5 µl de dNTP mix 10 mM (Amersham Biosciences), 1,0 µl de cada um dos oligonucleotídeos, 1,0 U de enzima *Taq* DNA Polimerase (1U/µl, Biotools®). A amplificação foi executada em termociclador automático (Eppendorff® Mastercycler gradient) consistindo em um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com uma temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos.

4.6.3. Amplificação de seqüência genética de *Hepatozoon* spp.

Foi utilizado um par de oligonucleotídeos internos para a realização da PCR para *Hepatozoon* spp. As seqüências amplificaram um fragmento do gene codificador da subunidade 18S do RNA ribossomal, originando um produto de aproximadamente 625 pb. Os iniciadores Hep *foward* (5^f ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC 3^f) com 21 bases e Hep *reverse* (5^f CTT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG 3^f) com 17 bases foram utilizados conforme descrito por INOKUMA *et al.* (2002), que consideraram as seqüências de *Hepatozoon canis*, *H.americanum*

e *H. catesbiana* depositadas no GenBank (AF176835; AF176836 e AF176837) para construção dos oligonucleotídeos.

As mistura de PCR para a amplificação parcial do gene 18S rRNA foi composta de: 2,5 µL de tampão 10 x (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, Amersham Biosciences®); 1,0 µL (2,0 mM) de MgCl₂; 0,5 µL de deoxinucleotídeo (dNTPs) mix 0,2 mM (Amersham Biosciences®); 1 µL (1µM) de cada iniciador HepF e HepF e 1,5 µL (1,5 U) de enzima *Taq* DNA Polimerase (Pharmacia®) em um volume final de 25 µL.

A PCR foi executada em termociclador automático (Eppendorf® Mastercycler gradient), consistindo em um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Foi realizada a extensão final a 72°C por 7 min.

Para verificação de contaminação nas reações de PCR foi utilizado em cada bateria de reações um controle negativo através da substituição do DNA da amostra por H₂O Milli-Q autoclavada. O controle positivo de DNA genômico foi obtido de cães naturalmente infectados por *Babesia* sp. e *Hepatozoon* sp., confirmado pela presença de merozoítos intraeritrocíticos ou gametócitos no interior de leucócitos, visualizados em esfregaço sangüíneo através de microscopia óptica.

4.7. Visualização dos produtos de amplificação por Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas dos produtos amplificados da PCR (8 µL) foram adicionadas a 2 µl de “loading buffer” e submetidas à eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL®) 2% em solução de TAE 1 x (Tris-base 0,4 M; ácido acético 0,2 M e solução de EDTA 0,5 M, pH 8.0). O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal Hoeker HE 33 (Amersham Pharmacia Biotech®) a 100 volts por 1 hora. As bandas foram visualizadas em transluminador UV (Amersham Pharmacia Biotech®). Para a estimativa do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder, Amersham

Biosciences[®]). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação de aproximadamente 450 pb para *Babesia* sp. e 625 pb para *Hepatozoon* sp.

4.8. Purificação dos produtos da PCR

Para a obtenção da banda específica para o seqüenciamento direto, os produtos de PCR com tamanhos de 450 pb e 625 pb foram extraídos e purificados utilizando o Kit Montage[™] PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore[®]). Os produtos purificados foram diluídos em 20 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM). Cada amostra foi devidamente identificada e acondicionada em freezer a -20^o para posterior utilização.

4.9. Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento do produto de PCR amplificado de uma amostra de sangue dos gatos foi executado em ambas as direções utilizando o “ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Aproximadamente, 4 µl do DNA purificado a 5 ng/µl, para cada reação de seqüenciamento, foram adicionados à 3,2 pmol dos oligonucleotídeos (forward e reverse) utilizados na reação de amplificação e 6 µl de 2,5 x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂).

As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra[®] (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C/segundo, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. A análise das seqüências de DNA foi determinada em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems[®]).

4.10. Precipitação

Para a reação de seqüenciamento foram adicionados 80 µl de isopropanol 65%, e, a seguir, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a velocidade de 10.000 rpm por 25 minutos, a temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo o tubo e, a seguir, adicionou-se 200 µl de etanol 70% e centrifugou-se a velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. A amostra foi seca a temperatura ambiente e o DNA foi eluído em 2 µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, USA) a amostra foi aquecida a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferida para o gelo.

4.11. Análise da seqüência

A seqüência *forward* e *reverse*, gerada automaticamente, foi alinhada com auxílio dos programas MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e CLUSTAL W versão 1.8. A seguir foi comparada com outras disponíveis no GenBank, e identificada utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Posteriormente a seqüência foi utilizada para construção da árvore filogenética utilizando-se o programa MEGA versão 2.1 (Kumar et al., 2001). Taxas de divergência foram conduzidas, utilizando-se os métodos de máxima parsimônia (MP) e distância (NJ) na reconstrução filogenética do fragmento estudado. Para se estimar o índice de consistência das análises de distância foram utilizadas árvores com teste de bootstrap sobre 1000 réplicas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Esfregaço sangüíneo

Pela análise do esfregaço sangüíneo de sangue da veia jugular, das 144 amostras deste estudo, foram observadas estruturas intraeritrocitárias similares a piroplasmídeos em cinco gatos (3,47%). Desses, uma (0,69%) amostra era de um animal proveniente de São Paulo (área urbana); três (2,08%) de Vargem Grande do Sul (área rural) e um (0,69%) de Piracicaba (área urbana). Nas diversas regiões do Distrito Federal não foram detectados animais positivos em lâmina.

Não foram visualizados gametócitos de *Hepatozoon* sp. em nenhum animal das regiões estudadas.



FIGURA 2. Aspecto microscópico de trofozoítos de *Babesia* sp. (seta) observados em lâmina de esfregaço sangüíneo de gato, corado com Giemsa (1.000x).

5.2. Procura de Carrapatos

Não foi encontrado nenhum exemplar de carrapato em nenhum dos animais examinados.

5.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das 144 amostras de sangue coletadas nesse estudo, apenas 110 foram submetidas ao teste de PCR. As demais não possuíam o volume exigido para realização do mesmo, sendo utilizadas somente para o exame através do esfregaço sangüíneo.

Do total de amostras analisadas, apenas uma (0,9%) foi positiva pela PCR para *Babesia* sp., e a banda visualizada apresentou peso molecular de 450 pb. Esse animal era proveniente de Piracicaba-SP e uma pesquisa posterior demonstrou que era uma fêmea, SRD, com mais de 10 anos e que havia sido encaminhada ao médico veterinário com suspeita de insuficiência renal crônica.

Todas as amostras foram negativas para *Hepatozoon* sp., tanto pela técnica de esfregaço sangüíneo quanto pela PCR.

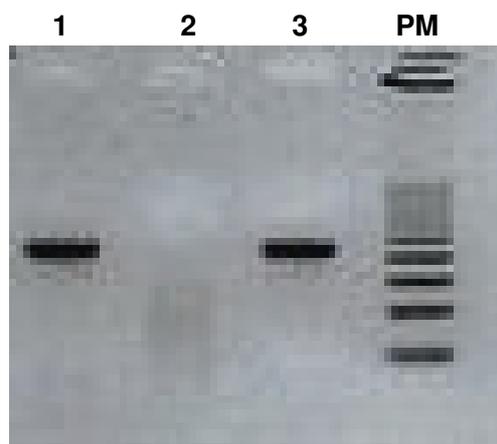


FIGURA 3. Eletroforese do produto amplificado de DNA para *Babesia* spp., em gato, pela técnica de PCR. Amostra 1 positiva para presença de *Babesia* spp..

Amostras 2 e 3 utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. PM: Padrão de peso molecular de 100pb.

5.4. Seqüenciamento

O alinhamento da seqüência de nucleotídeos obtida da amostra positiva para *Babesia* sp. na PCR foi realizado e, a seguir essa foi comparada com outras seqüências disponíveis no GenBank (*Babesia canis vogeli* – Brasil (AY371196), *Babesia canis vogeli* – EUA (AY371198), *Babesia* sp. – Okinawa (AY077719), *Babesia canis vogeli* – Egito (AY371197), *Babesia canis canis* – Rússia (AY649326), *Babesia canis canis* – Europa (AY72926), *Babesia canis rossi* (DQ111760), *Babesia ovis* (AY53346) e *Babesia felis* (AY452707)).

Foram utilizados no alinhamento 442 pares de bases (Figura 4). A comparação com as seqüências do GenBank permitiu verificar que essa amostra é de *Babesia canis vogeli*.

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

Bccanis_Russia      CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bccanis_Europa      CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Gato_Brasil         CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bcvogeli_USA        CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bcvogeli_Brazil     CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Babesia sp. Okinawa CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bcvogeli_Egypt      CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bcrossi             CCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bfelis              CCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
Bovis               CCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA
*****

```

```

Bccanis_Russia      CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCGAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bccanis_Europa      CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCGAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Gato_Brasil         CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bcvogeli_USA        CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bcvogeli_Brazil     CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Babesia sp. Okinawa CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bcvogeli_Egypt      CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bcrossi             CACGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAAT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
Bfelis              CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAATTGGAATGA
Bovis               CACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTACT-GTCTTGTAAATTGGAATGA
***

```

```

Bccanis_Russia      TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bccanis_Europa      TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Gato_Brasil         TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bcvogeli_USA        TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bcvogeli_Brazil     TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Babesia sp. Okinawa TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bcvogeli_Egypt      TGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bcrossi             TGGTGACTTAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bfelis              TGGGGACCTAAACCCCTCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
Bovis               TGGCGACCCAAACCCCTCGCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
***

```

```

Bccanis_Russia      GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGT
Bccanis_Europa      GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGT
Gato_Brasil         GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Bcvogeli_USA        GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Bcvogeli_Brazil     GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Babesia sp. Okinawa GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Bcvogeli_Egypt      GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Bcrossi             GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGT
Bfelis              GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTGTGTCAGTTAAGAAGCTCGTAGTTGA
Bovis               GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
*****

```

```

Bccanis_Russia      ATTTTTCGTTA-----GCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTCGCT--
Bccanis_Europa      ATTTTTCGTTG-----ACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTCGCT--
Gato_Brasil         ATTTTAGCGTGT-----TCGAGTTTGCCATTCGTTGGCTTTTTCGAGTTCGCT--
Bcvogeli_USA        ATTTTAGCGTGT-----TCGAGTTTGCCATTCGTTGGCTTTTTCGAGTTCGCT--
Bcvogeli_Brazil     ATTTTAGCGTGT-----TCGAGTTTGCCATTCGTTGGCTTTTTCGAGTTCGCT--
Babesia sp. Okinawa ATTTTAGCGTGT-----TCGAGTTTGCCATTCGTTGGCTTTTTCGAGTTCGCT--
Bcvogeli_Egypt      ACTTTAGCGTGT-----TCGAGTTTGCCATTCGTTGGCTTTTTCGAGTTCGCT--
Bcrossi             ATTTTTCGCTTTG-----GCGGTTTGCTTTGGCTTTGATTCCGCTTGGCT--
Bfelis              ATTTCTGCCTCGCTTTGGTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGCATATTTCT
Bovis               ACTTCGGCTTG-----CGCTCCTGCGG--GTCTGCGCGCGGCC--
* * * * *

```

```

Bccanis_Russia      -----TTTGGGAA---TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bccanis_Europa      -----TTTGGGAA---TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Gato_Brasil         -----TTTGGGT---TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bcvogeli_USA        -----TTTGGGT---TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT

```

```

Bcvogeli_Brazil      -----TTTGGGT----TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Babesia sp. Okinawa -----TTTGGGT----TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bcvogeli_Egypt       -----TTTGGGT----TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bcrossi              -----TTTGGCTT---TTTGCC--TTATTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bfelis               GGATTTGTGTGCTTCGGCTTCTCTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
Bovis                -----TTTGGGT----TTTCCC--TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTT
                    *** *          *****
                    *****

Bccanis_Russia      CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bccanis_Europa      CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Gato_Brasil         CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bcvogeli_USA        CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bcvogeli_Brazil     CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Babesia sp. Okinawa CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bcvogeli_Egypt      CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bcrossi              CAAGCAGAC-TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCT
Bfelis               CAAACAGGCCCTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCT
Bovis                CAAGCAGGC-TTTCGCCGTGAATACTTGAGCATGGAATAACTGGCAGGACCTTGGTTCT
                    *** ** * ** * * ***** ***** * *****

Bccanis_Russia      ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bccanis_Europa      ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Gato_Brasil         ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bcvogeli_USA        ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bcvogeli_Brazil     ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Babesia sp. Okinawa ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bcvogeli_Egypt      ATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bcrossi              ATTTTGTGGTTTGGGAACCTTGGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
Bfelis               ATTTTGTGGTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCATT
Bovis                TCTTTGTGGTTTTT-GTACCTGGGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
                    ***** * ** * ***** * *****

```

FIGURA 4. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Os sítios polimórficos são evidenciados pela ausência do símbolo (*). Os símbolos (-) representam a ausência de nucleotídeos (gaps).

5.5. Análise Filogenética

A análise filogenética demonstrou que a subespécie de *Babesia* isolada do animal deste estudo é *B. c. vogeli*, com 100% de identidade com *B. c. vogeli* já caracterizada no Brasil. A seqüência também foi idêntica com *B. c. vogeli* descrita em Okinawa, Japão. Em relação às amostras de *B. c. vogeli* do Egito, a similaridade é de 99% e a seqüência mostrou a presença de dois sítios polimórficos (posições 242 e 284) representados por duas transições (T↔C). A similaridade com a amostra dos EUA também é de 99%, com o polimorfismo situado na posição 131, representado por uma transversão (A↔C).

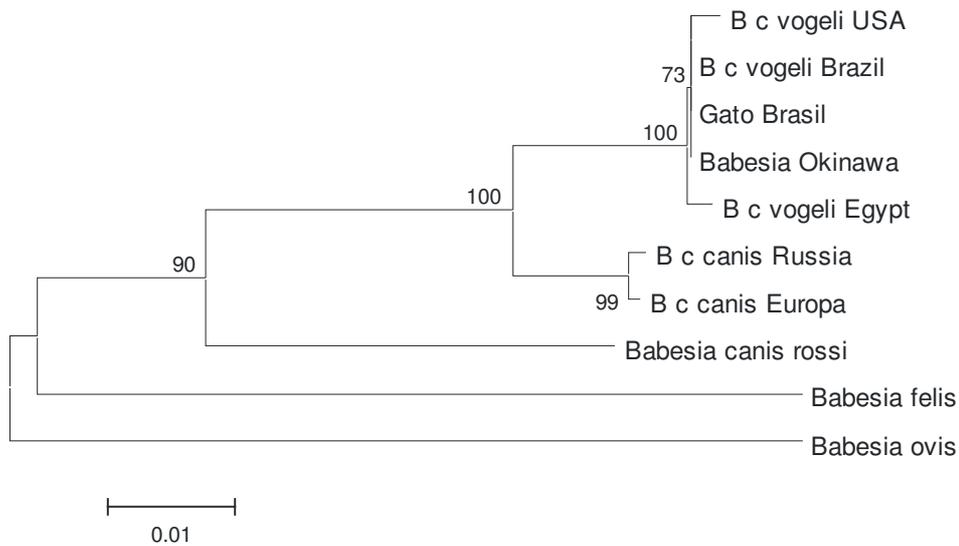


FIGURA 5. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene rDNA de *Babesia* sp. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Babesia canis vogeli* (USA, Egypti, Okinawa, Brazil), *Babesia canis canis* (Rússia, Europa), *Babesia canis rossi*, *Babesia ovis* e *Babesia felis* obtidas no GenBank foram utilizadas como outgroup. Gato Brasil- amostra de *B. c. vogeli* de um gato de área urbana do estado de São Paulo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No Brasil, poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados e pouco se conhece sobre hemoprotozoários em gatos domésticos. Os trabalhos publicados sobre *Babesia* foram feitos utilizando apenas a avaliação do esfregaço sangüíneo, técnica considerada pouco específica e sensível. A caracterização de *Babesia* encontrada em gatos domésticos com base em dados moleculares é escassa, sendo presente somente em alguns países e totalmente ausente no Brasil. Sendo assim, este trabalho que avaliou a infecção em gatos utilizando a PCR é inédito no Brasil.

Foram observados cinco gatos (3,47%) com estruturas intraeritrocíticas semelhantes à trofozoítos de *Babesia* pela técnica do esfregaço sangüíneo. Posteriormente, desses cinco animais, apenas um foi positivo para *Babesia* sp. pela PCR. Uma hipótese para esse resultado é que os outros animais poderiam não estar infectados com *Babesia* sp. e os corpúsculos encontrados poderiam ter sido confundidos com *Cytauxzoon felis*, *Mycoplasma haemofelis* ou até mesmo com precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly ou ponteados basofílios, o que é comum acontecer, visto que todos podem apresentar aparência muito semelhante (SCHOEMAN *et al.*, 2001; PENZHORN *et al.*, 2001). Outra hipótese é que os animais poderiam estar infectados com outros piroplamídeos que não puderam ser detectados pelos Primers utilizados. O resultado obtido indica que a caracterização específica de parasitas sangüíneos, baseando-se apenas na morfologia, pode não ser correta.

Entretanto, como normalmente ocorre em estudos comparativos entre esfregaço sangüíneo e PCR, era esperado um resultado maior de amostras positivas pela PCR do que o número de suspeitos pelo esfregaço. Estudos epidemiológicos mostraram que animais negativos em microscopia óptica foram positivos na PCR devido à baixa sensibilidade do primeiro teste (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; JITTAPALAPONG *et al.*, 2006).

Assim como descrito por PASSOS *et al.* (2005), SÁ (2005) e LOPES (2006), que em seus trabalhos verificaram apenas a existência de *B. canis vogeli* em cães no Brasil, a análise genética do piroplasmídeo encontrado neste estudo indicou que o mesmo se tratava da espécie canina, sendo também

considerada *B. c. vogeli*, apresentando alta similaridade com o isolado já descrito no país (PASSOS *et al.*, 2005).

Apesar do resultado obtido pelo seqüenciamento evidenciar 100% de similaridade com a *B. c. vogeli* já caracterizada no Brasil, os trofozoítos de *Babesia* encontrados neste estudo eram visivelmente menores do que os da mesma espécie normalmente observados em eritrócitos caninos. Essa variação de tamanho pode ser explicada pelas diferenças entre os eritrócitos de cães e gatos, sendo maiores e bicôncavos nos primeiros e menores e mais compactos nos últimos (BANETH *et al.*, 2004). Variações de forma e tamanho de acordo com o hospedeiro já foram descritas anteriormente. HOMER *et al.* (2000) descreveram que *Babesia divergens*, parasita de bovinos, muda sua aparência quando infecta seres humanos, dificultando o diagnóstico correto. Além disso, nenhuma forma em cruz de Malta (tétrades), típicas de algumas espécies de pequenas babesias felinas, como *B. felis* e *B. leo* (BOURDEAU, 1996; PENZHORN *et al.*, 2001), foi observada e o número máximo de parasitas no interior dos eritrócitos foi de um, enquanto mais de oito parasitas já foram relatados para *B. cati* (MUDALIAR *et al.*, 1950) e para espécies não caracterizadas de *Babesia* em felinos domésticos no Zimbábwe (STEWART *et al.*, 1980).

No Brasil, *B. canis vogeli* é endêmica em cães (PASSOS *et al.*, 2005). Em outros países parece ser relativamente comum também em gatos domésticos. A detecção de *B. canis* em gatos domésticos já havia sido relatada por CRIADO-FORNELIO *et al.* (2003), que fizeram a caracterização molecular do agente em três gatos na Europa, porém utilizando outro protocolo de PCR e com a identificação de outra subespécie, *B. c. canis*, com 100% de identidade quando comparada aos isolados caninos. Na ocasião, esses animais foram negativos pelo exame microscópico do esfregaço sangüíneo. BANETH *et al.* (2004) ao estudarem dois gatos domésticos em Israel, também diagnosticaram *B. canis* nesse hospedeiro, contudo classificaram como uma nova subespécie: *B. canis presentii*.

Com o resultado do presente estudo associado a esses outros achados, pode-se concluir que *B. canis* pode infectar gatos. NAVARRETE *et al.* (1999) já haviam afirmado que a especificidade dos piroplasmídeos em relação a seus hospedeiros é provavelmente muito menor do que se suspeitava até

então. Os mesmos autores mencionaram que o uso de métodos mais sensíveis, como a PCR, pode otimizar o diagnóstico e desvendar alguns novos hospedeiros não descritos anteriormente. Esses argumentos vão ao encontro dos resultados deste estudo, demonstrando que cães e gatos podem dividir os mesmos parasitas. O fato de que esses parasitas infectam uma grande variedade de espécies de hospedeiros e podem se apresentar como múltiplas infecções abre um novo entendimento desses agentes e novas perguntas sobre a correlação entre esses resultados e as espécies de *Babesia* previamente descritas em felinos. Esses achados demonstram haver uma maior diversidade de piroplasmas em felinos, do que havia sido estabelecido anteriormente.

O presente estudo parece representar a primeira detecção e caracterização molecular de *Babesia* spp. em gatos no Brasil, com uma metodologia sensível e específica. Apesar do encontro de somente um animal positivo na PCR, essa técnica deveria ser a técnica de escolha em estudos epidemiológicos, pois é altamente sensível e específica e permite, a partir do seqüenciamento, a caracterização genética dos parasitas encontrados. Provavelmente, a escassez de relatos sobre babesiose felina esteja relacionada com a baixa sensibilidade dos procedimentos diagnósticos adotados, mais do que simplesmente a real ausência do parasita no país.

No Brasil, a importância dos gatos como hospedeiros de *B. canis* ainda é desconhecida, pois a única amostra obtida neste estudo é insuficiente para delinear uma conclusão válida sobre a sua real abundância. São necessários estudos moleculares em outras regiões para que se tenha uma visão mais ampla sobre os agentes causadores da babesiose felina no nosso país.

Não pôde ser avaliada a patogenicidade desse parasita quando infecta gatos, visto que este não foi o objetivo principal do estudo. Mas, de acordo com estudos anteriores envolvendo *B. canis* em gatos, esses animais tornam-se hospedeiros assintomáticos, o que pode ser indicativo de uma baixa patogenicidade nesse hospedeiro. Se essa suposição fosse realmente confirmada, isso poderia ser interpretado como uma evidência de uma relação parasito-hospedeiro antiga (EBERT, 1998). Mas, assim como nos cães, alguns

gatos podem desenvolver sinais característicos da doença e, portanto, é importante não descartar a possibilidade de babesiose nesses animais.

O número de animais infectados no presente estudo (um) foi muito menor do que o esperado e do que o obtido em outros estudos epidemiológicos. CRIADO-FORNELIO *et al.* (2003) encontraram *B. c. canis* em 18,7% (3/16) dos gatos estudados e CRIADO-FORNELIO *et al.* (2004) detectaram a infecção por piroplasmídeos em 5% (5/100) desses animais. No Rio de Janeiro, 47% (22/47) dos gatos capturados por MENDES-DE-ALMEIDA *et al.* (2004) estavam infectados por piroplasmídeos. Contudo, a metodologia diagnóstica adotada neste estudo foi pouco específica, gerando ampla margem de erro, podendo o resultado obtido representar uma superestimativa de infecção. Tal fato pode ser evidenciado pelo resultado obtido no presente estudo, onde foram observados cinco animais com estruturas semelhantes a piroplasmídeos pelo esfregaço sangüíneo e apenas um foi positivo pela PCR. Infelizmente, nenhum estudo epidemiológico molecular envolvendo o diagnóstico de piroplasmídeos de gatos domésticos foi publicado até agora em outras regiões brasileiras. Sendo assim, fica difícil comparar dados epidemiológicos quando as técnicas de diagnóstico utilizadas possuem metodologias diferentes ou foram realizadas em outras regiões ou outros países, com situação epidemiológica diversa. Além disso, a diferença da prevalência entre os estudos pode estar relacionada às diferentes épocas de coleta no ano, às diferentes condições ambientais a que estavam submetidos os animais, à diferente biologia dos possíveis vetores e finalmente ao estado de saúde dos hospedeiros.

Sabe-se que animais cronicamente infectados por *Babesia* spp. podem apresentar parasitemia em nível inferior à sensibilidade da PCR, o que é demonstrado em estudos em que os animais foram negativos na PCR e positivos na Nested-PCR (BÖSE *et al.*, 1995). É importante ressaltar, entretanto, que o limite de detecção do protocolo de PCR utilizado no presente estudo teve sua sensibilidade avaliada por JEFFERIES *et al.* (2003), sendo capaz de detectar *Babesia* sp. com parasitemia de até 0,0000027% (1 hemácia parasitada em 4 milhões).

Não era esperada a ausência de gatos positivos para *Hepatozoon* sp., já que em relatos anteriores realizados na mesma região, gametócitos e

DNA do parasita foram detectados em três animais de uma mesma residência (PEREZ *et al.*; 2004 e RUBINI *et al.*, 2006). Não fica aqui descartada a hipótese de que o encontro de animais infectados nessa ocasião pode ter sido um achado incidental, sem significado clínico aparente. A baixa prevalência observada no presente estudo está de acordo com os resultados obtidos por BANETH *et al.* (1998) em 7/1229 gatos domésticos em Israel e por CRIADO-FORNELIO *et al.* (2006), que coletaram sangue de 330 gatos domésticos e em apenas dois animais a infecção por *Hepatozoon* foi constatada através da PCR. Em contrapartida, JITTAPALAPONG *et al.* (2006) diagnosticaram o parasita em 32,3% (97/300) dos gatos estudados. Uma alta prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. também foi observada por KUBO *et al.* (2006), porém com métodos diagnósticos diversos dos citados anteriormente. Esses autores detectaram 31,9% (23/72) dos animais parasitados através de técnicas histopatológicas. Provavelmente, essas diferenças de prevalência podem ser explicadas pela presença do artrópode vetor, contudo, mais estudos envolvendo esse aspecto são necessários para se confirmar essa hipótese. Vale ressaltar que uma comparação dos dados obtidos em outros países deve ser feita com cautela, visto que envolvem diferenças epidemiológicas marcantes, como clima, presença ou não de vetor, dentre outras.

Estudos anteriores demonstraram que a pesquisa de esquizontes de *Hepatozoon* sp. através de biópsias de músculo cardíaco e esquelético, fígado e baço obteve bons resultados (KUBO *et al.*, 2006; EWING, 1977; KLOPFER *et al.*, 1973). Talvez com a utilização desse método, nos mesmos animais do presente estudo, poder-se-ia detectar positivos, pois a PCR não identifica animais positivos, e sim, se na amostra colhida está ou não presente o DNA a ser estudado.

Sendo o protozoário transmitido pela ingestão de carrapatos contaminados, outra hipótese que explicaria a ausência de animais parasitados seria a ingestão mais seletiva que os gatos possuem quando comparados aos cães. Outro estudo comparativo com os cães que habitam no mesmo local que os gatos poderia ajudar a elucidar se aqueles e os carrapatos não tinham o parasita. Entretanto, o resultado negativo para todas as amostras não é suficiente para afirmar a ausência do parasita em gatos domésticos no Brasil.

A ausência de carrapatos nos animais deste estudo está de acordo com MENDES-DE-ALMEIDA *et al.* (2004), que estudaram 47 gatos e os únicos ectoparasitas encontrados foram pulgas. Em contrapartida, SHIMADA *et al.* (2003) examinaram 126 gatos no Japão e conseguiram coletar 282 carrapatos de diferentes espécies. Nessa ocasião, os autores não observaram diferença estatística significativa entre animais de área urbana e rural. Segundo SHAW *et al.* (2001), os gatos parecem ser menos predispostos às infestações por carrapatos e aos parasitas transmitidos por esses artrópodes do que os cães. Sendo a babesiose e a hepatozoonose felina transmitidas por carrapatos, assim como nos outros animais, a baixa ocorrência de animais infectados por esses hemoparasitas no atual estudo pode estar intimamente relacionada à ausência desses ectoparasitas nesses animais.

O presente estudo demonstrou a baixa ocorrência de hemoprotozoários em gatos domésticos. Entretanto, possibilitou o diagnóstico de uma espécie de *Babesia* antes relatada como sendo específica de cães. Assim, estudos posteriores, em outras regiões, utilizando a PCR ou até mesmo a Nested-PCR poderão elucidar a verdadeira situação epidemiológica desses hemoparasitas em gatos no Brasil.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias empregadas e o método de análise, o estudo realizado em gatos de áreas rurais e urbanas do Estado de São Paulo e no Distrito Federal nos permitiu concluir que:

1. A ocorrência de infecções por *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp. em gatos nas regiões estudadas foi nula ou baixa, respectivamente;
2. Os resultados obtidos sugerem que os hemoparasitas estudados não têm importância epidemiológica nessas regiões.
3. O diagnóstico de *Babesia canis* pela técnica de PCR foi mais específico do que o diagnóstico por esfregaço sangüíneo;
4. Cães e gatos podem compartilhar a mesma espécie de hemoprotozoário;
5. A infestação por carrapatos não é comum em gatos domésticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTAREM, V. A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores of wild carnivores in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 70, p. 279-282, 1997.
- ALMOSNY, N. R. P.; ALMEIDA, L. E.; MOREIRA, N. S.; MASSARD, C. L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Rev. Bras. Cien. Vet.** v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998.
- AVERBECK, G. A.; BJORK, K. E.; PACKER, C.; HERBST, L. Prevalence of haematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) on Serengi National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. **J. Wildlife Dis.** v. 26, p. 392-282, 1990.
- BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Int. Med.** v. 11, p. 365-370, 1997.
- BANETH G.; AROCH, I.; TAL, N.; HARRUS, S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. **Vet. Parasitol.** v. 79, p. 123-133, 1998.
- BANETH, G.; BARTA, J. R.; SHKAP, P.; MARTIN, D. S.; MACINTIRE, D. K.; VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 1298-1301, 2000.
- BANETH, G.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; ANUG, Y.; SHKAP, V.; LEVY, A.; SHAW, S. E. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *Presentii*, in domestic cats. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n.1, 99-105, 2004.
- BANETH, G.; MATHEW, J. S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D. K.; BARTA, J. R.; EWING, S. A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitol.** v. 19, p. 27-31, 2003.
- BANETH, G.; SHKAP, V. *Hepatozoon* sp. Parasitemia in a domestic cat. **Feline Practice.** v. 23, n. 2, p. 10-12, 1995.
- BARR, S. C.; BOWMANN, D. D.; PHILLIPS, L. G.; BARR, M. C. *Trypanossoma manulis* n. sp. From the Russian pallas cat *Felis manul*. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 40, p. 233-237, 1993.

- BATHIA, B. L. Protozoa: Sporozoa in the fauna of British India (Taylor & Francis, London). 1938.
- BENTLEY, C. A. Preliminary note upon a *Leucocytozoon* of the dog. **Br. Med. J.** v. 1, p. 1018, 1905.
- BEAUFILS, J-P.; GRANEL, J. M.; JUMELLE, P. *Hepatozoon* spp. parasitemia and feline leukemia virus infection in two cats. **Fel. Pract.** v. 26, p. 10-13, 1998.
- BEAUFILS, J-P. Un cas d'hépatozoonose chez un chat. **Le Nouveau Praticien Veterinaire.** v. 547, p. 39, 2004.
- BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Vet. Clin. Small Anim.** v. 33, p. 885-904, 2003.
- BÖSE, R.; JORGENSSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; de VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.** v. 57, p. 61-74, 1995.
- BOSMAN, A.-M.; VENTER, E. H.; PENZHORN, B. L. 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.** v. 144, n. 1-2, p. 33-38, 2006.
- BOURDEAU, P. Les babésioses félines. **Le Point Veterinaire.** v. 27, n. 173, p. 43-49, 1996.
- BROCKLESBY, D. W.; DENNIG, H. K.; VIDLER, B. O. A *Babesia* species of the leopard (*Panthera pardus*) and its transmission to the domestic cat (*Felis catus*). Progress in Protozoology. 177-178p. **Proceedings of the Second International Conference on Protozoology. International Congress Series.** n. 91, Amsterdam: Excerpta Medica. 1965.
- BROCKLESBY, D. W.; VIDLER, B. O. Some new host records for *Hepatozoon* species in Kenya. **Vet. Record.** v. 75, p. 1265, 1963.
- CARPANO, M. Sur les piroplasmoses des carnassiers et sur un nouveau piroplasma des félins (*Babesiella felis*) chez le puma: *Felis concolor*. **Bulletin, Ministry of Agriculture, Egyptian Technical and Scientific Service.** n. 136, 20 pp, 1934.

-
- CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M. A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. The “expanding universe” of piroplasms. **Vet. Parasitol.** v. 119, p. 337-345, 2004.
- CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol.** v. 113, p. 189-201, 2003.
- CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Vet. Microbiol.** v. 93, p. 307-317, 2003a.
- CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Vet. Parasitol.** v. 114, p. 173-194, 2003b
- CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J. L.; CASADO, N.; FARIAS, N. A. R.; SOARES, M. P.; MÜLLER, G.; BRUM, J. G. W.; BERNE, M. E.A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C.. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **J. Parasitol.** v. 92, (1), p. 93-99, 2006.
- DAVIS, L. J. On a piroplasm of the sudanese wild cat (*Felis ocreata*). **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 22, p. 523-534, 1929.
- DENNIG, H. K. Babesieninfektionem bei exotischen katzen und die bedeutung dieser blutparasiten für die tierärztliche forschung. **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia.** v. 48, p. 361-367, 1969.
- DENNIG, H. K. Eine unbekannte Babesienart beim Jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*). **Die kleintierpraxis.** n. 12, p. 146-152, 1967a.
- DENNIG, H. K. Untersuchungen zu einer neuen Babesienart der feliden. **Kongressbericht über die III. Tagung der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft. e. V., Hamburg.** p. 79-85, 1967b.

- DENNIG, H. K. Vergleichende Untersuchungen über die Babesien tropischer Feliden unter besonderer Berücksichtigung einer neuen Spezies. **Habilitationsschrift, Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich**. 1967c.
- DENNIG, H. K.; BROCKLESBY, D. W. *Babesia pantherae* sp. nov. a piroplasm of the leopard (*Panthera pardus*). **Parasitol.** v. 64, p. 525-532, 1972.
- DENNIG, H. K.; HEBEL, R. Fine structure of *Babesia* spp. from felidae. **J. Parasitol.** v. 56, p. 73, 1970.
- DENNIG, H. K.; HEBEL, R. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an zwei *Babesia*-Arten der Feliden. **Zeitschrift für Parasitenkunde.** v. 32, p. 95-111, 1969.
- EBERT, D. Experimental evolution of parasites. **Sci.** v. 282, p. 1432-1435, 1998.
- EWING, G. O. Granulomatous cholangiohepatitis in a cat due to a protozoan parasite resembling *Hepatozoon canis*. **Fel. Practice.** v. 7, p. 37-40, 1977.
- FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C. Studies on feline babesiosis. 1. Historical review. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 50, n. 2, p. 105-106, 1980a.
- FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C. Studies on feline babesiosis. 2. Clinical observations. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 51, n. 3, p. 143-146, 1980b.
- FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C. Studies on feline babesiosis. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 50, n. 2, p. 105-106, 1980.
- FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C.; VAN DEN BERG, A. Studies on feline babesiosis. 3. Haematological findings. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 51, n. 4, p. 271-280, 1980.
- FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C.; VAN DEN BERG, A.; VAN RIJSWIJK, A. W. Studies on feline babesiosis. 4. Chemical pathology; macroscopic and microscopic *post mortem* findings. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 52, n. 1, p. 5-14, 1981.
- GAZETA, G. S.; MONTEIRO, A.; ABOUD-DUTRA, A. E.. Babesiose felina no Brasil: uma nova espécie? **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, MG, 2004.

- GLENN, B. L.; ROLLEY, R. E.; KOCAN, A. A. *Cytauxzoon*-like piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 181, p. 1251-1253, 1982.
- GOSSET, K. A.; GAUNT, S. D.; AJA, D. S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Ass.** v. 21, p. 265-267, 1985.
- HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S. R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Reviews.** v. 13, p 451-469, 2000.
- INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.** v. 106, p. 265-271, 2002.
- JACKSON, C.; DUNNING, F. J. Biliary fever (Nuttalliosis) of the cat: a case in the Stellenbosch district. **J. South Afr. Vet. Ass.** n. 8, p. 83-87, 1937.
- JACOBSON, L. S.; CLARK, I. A. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 65, p. 134-145, 1994.
- JACOBSON, L. S.; SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G. A survey of feline babesiosis in South Africa. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 71, n. 4, p. 222-228, 2000.
- JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; MUHINICKEL, C. J.; IRWIN, P. J. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. **J. Parasitol.** v. 89, p. 409-12, 2003.
- JITTAPALAPONG, S.; JANSAWAN, W. Preliminary survey on blood parasites of cats in Bangkhen District area. **Kasetsart J. Natural Sci.** v. 27, p. 330-335, 1993.
- JITTAPALAPONG, S.; RUNGPHISUTTHIPONGSE, O.; MARUYAMA, S.; SCHAEFER, J. J.; STICH, R. W.. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1081, p. 479-488, 2006.
- KJEMTRUP, A. M.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A. J.; CUMMINGS, J.; BUDREAUX, M. K.; STOCKHAM, S. L.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; CONRAD, P. A. There are at least three genetically

- distinct small piroplasmas from dogs. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1501-1505, 2000.
- KLOPFER, U.; NOBEL, T. A.; NEUMANN, F. Hepatozoon-like parasite (schizonts) in the myocardium of the domestic cat. **Vet. Pathol.** v. 10, p. 185-190, 1973.
- KUBO, M.; MIYOSHI, N.; YASUDA, N. Hepatozoonosis in Two Japanese Wild Cat. **J. Vet. Med. Sci.** v. 68, n. 8, p. 833-837, 2006.
- LANE, J. R.; KOCAN, A. A. *Hepatozoon* infection in bobcats. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 183, p. 1323-1324, 1983.
- LEEFLANG, P.; ILEMOBADE, A. A. Tick-borne diseases of domestic mammals in northern Nigeria. **Trop. Anim. Prod.** v. 9, p. 211-218, 1977.
- LEGER, N.; FERTE, H.; BERTHELOT, P.; NOURRY, D.; BROCVIELLE, P. Un case de babesiose feline en Haute-Saone France. **Sci. Vét. Méd. Comp.** v. 94, p. 249-252, 1992.
- LOPES, V. V. A. **Estudo parasitológico e molecular da infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo.** 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; PENZHORN, B. L.; WAAL, D. T.; LEWIS, B. D. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. **J. Wildlife Dis.** v. 35, n. 1, p. 82-85, 1999.
- MANGRULKAR, M. Y. On a piroplasm of the indian cat (*Felis domesticus*). **Indian J. Vet. Sci. Anim. Husbandry.** v. VII, pt. III, p. 243-246, 1937.
- MARSH, A. E.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. S.; HO, M.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. **J. Parasitol.** v. 81, p. 530-535, 1995.
- MATHEW, J. S.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; EWING, S. A.; MALAYER, J. R.; LATHA, B. R.; PANCIEIRA, R. J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **J. Parasitol.** v. 86, n. 2, p. 366-372, 2000.

- McCULLY, R. M.; BASSON, P. A.; BIGALKE, R. D.; DeVOSS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Research.** v. 42, p. 117-134, 1975.
- McNEIL, J. Piroplasmiasis of the domestic cat. **J. South Afr. Vet. Ass.** n. 8, p. 88-90, 1937.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C. F.; BRANO, A. S.; SERRÃO, M. L.; SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N.; CHAME, M.; LABARTHE, N. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.
- MERCER, S. H.; JONES, L. P.; RAPPOLE, J. H.; TWEDT, D.; LAACK, L. L.; CRAIG, T. M. *Hepatozoon* sp. in wild carnivores in Texas. **J. Wildlife Dis.** v. 24, p. 574-576, 1988.
- MOIK, K.; GOTHE, R. Baesien-infektionen der feliden und fallbeschreibung bei einer katze in Deutschland. **Tierärztliche Praxis.** v. 25, p. 532-535, 1997.
- MUDALIAR, S. V.; ACHARY, G. R.; ALWAR, V. S. On a species of Babesia in an indian wild cat (*Felis catus*). **Indian Vet. J.** v. XXVI, n. 5, p. 391-395, 1950.
- NAVARRETE, I.; NIETO, O.. Babesiosis, hepatozoonosis, citauxzoonosis felinae. In: CORDERO-DEL-CAMPILLO, M.; ROJO-VAZQUEZ, F. A.. **Parasitología Veterinaria.** McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, pp. 672-678, 1999.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses.** Rio de Janeiro, L. F. livros de veterinária, p. 57-67, 2002.
- PALUDO, G. R.; FRIEDMANN, H.; DELL PORTO, A.; MACINTIRE, D. K.; WHITLEY, E. M.; BOUDREAUX, M. K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B. L.; DYKSTRA, C. C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res.** v. 97, n. 2, p. 167-70, 2005.

- PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 127, p. 81-5, 2005.
- PATTON, W. S. The haemogregarines of mammals and reptiles. **Parasitol.** v. 1, p. 318-321, 1908.
- PENZHORN, B. L.; KJEMTRUP, A.; LOPEZ-REBOLLAR, L.; CONRAD, P. A. *Babesia leo* sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. **J. Parasitol.** v. 87, p. 681-685, 2001.
- PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis in South Africa – A review. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1026, p. 183-186, 2004.
- PEREZ, R. R.; RUBINI, A.S.; ODWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo, Brazil. **Parasitol. Res.** v. 94, p. 83-85, 2004.
- PICHOTANO, M. E.; VARZIM, F. L. S. B.; SILVA, M. A. M. L.. Citauxzoonose: relato de caso. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**. Ouro Preto, MG, 2004.
- RICH, L. J.; COLES, E. H. Tables of abnormal values as a guide to disease syndromes. IN: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 4th edn. W. B. Saunders, Philadelphia, PA, p. 14, 1995.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; ODWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitol. Res.** v. 97, p. 91-93, 2005.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; PEREZ, R. R.; RIBOLLA, P. E. M.; ODWYER, L. H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 137 (1-2), p. 168-171, 2006.
- SÁ, A. G. **Detecção fenotípica e genotípica de *Babesia canis vogeli* em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) da região do Grande Rio naturalmente infectados**. Niterói, 2005. 60f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Clínica Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense.

- SCHOEMAN, T. **Clinical and clinico-pathological changes in feline babesiosis**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria.
- SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G.; JACOBSON, L. S.; PENZHORN, B. L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. **Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.** v. 72(1), p. 4-11, 2001.
- SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **J. Fel. Med. Surg.** v. 3, p. 193-209, 2001.
- SHIMADA, Y.; INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; ONISHI, T. Survey of ixodid tick species on domestic cats in Japan. **Vet. Parasitol.** v. 11, p. 231-239, 2003.
- SHKAP, V.; BANETH, G.; PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **J. Vet. Diag. Invest.** v. 6, p. 121-123, 1994.
- SHORTT, LIEUT-COLONEL, H. E. *Babesia* sp. in the indian leopard, *Panthera pardus fusca* (Meyer). **Indian J. Med. Res.** v. 28, n. 1, July, p. 277-278, 1940.
- SOARES, A. L.; SOUZA, A. D.; FELICANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; DÁGOSTO, M. DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 15, p. 13-16, 2006.
- SOARES, C. O.; SCOFIESD, A.; MASSARD, C. L.; PEIXOTO, P. V.; SANTIAGO, C. D.; GONZALES, A. A. P.; FONSECA, A. H. Ocorrência de *Hepatozoon felis* (Patton, 1908) (Apicomplexa:Adeleina) em *Felis tigrina* (= *Leopardus tigrinus*). In: **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Salvador, 235p. 1999.
- SOUZA, A. M. **Avaliação do hemograma, plaquetometria e da frequência de *Haemobartonella felis* (FLINT & ROSS, 1953) e de um provável *Theileriidae*, ocorrentes em *Felis catus* (LINNAEUS, 1758) na região do Grande Rio (RJ)**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense.

- STEWART, C. G.; HACKETT, K. J. W.; COLLETT, M. G. An unidentified *Babesia* of the domestic cat (*Felis domesticus*). **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 51, n. 4, p. 219-221, 1980.
- TABOADA, J. Babesiosis. IN: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** 2nd edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 77: 473-481. 1998.
- TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** v. 21, n. 1, p. 103-123, 1991.
- UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F.; PERIE, N. M.; SPANJER, A. A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet. Q.** v. 11, p. 33-40, 1989.
- VAN AMSTEL, S. Hepatozoonosis in 'n kat. **J. South Afr. Vet. Ass.** v. 50, p. 215-216, 1979.
- VINCENT-JOHNSON, N. A.; MACINTIRE, D. K.; LINDSAY, D. L.; LENZ, S. D.; BANETH, G.; SHKAP, V.; BLAGBURN, B. L. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **J. Parasitol.** v. 83, p. 1165-1172, 1997.
- WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A. NYSKA, A. *Hepatozoon canis*: size measurement of gametocyte using image analysis technology. **Comp. Haematol. Int.** v. 4, p. 177-179, 1994.
- WENYON, C. M. **Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologists.** Wood, New York. 1926.
- WENYON, C. M.; HAMERTON, E. A. Piroplasms of the West African civet cat (*Viverra civetta*) and the bay lynx (*Felis rufa*) of North América. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** n. 24, p. 7-8, 1930.
- WOZNIAK, E. J.; TELFORD, J.R.; MCLAUGHLIN, G. L. Employment of the Polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventive zoological medicine. **J. Zôo. Wild. Med.** v. 25, n. 4, p. 538-547, 1994.

A survey of hemoprotezoans from cats in Brazil: *Babesia canis vogeli* in a naturally infected cat.

Marcella Pires Mendes Carneiro^{*}, Viviane von Ah Lopes, Karina dos Santos Paduan, Lucia Helena O'Dwyer

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Parasitologia. CEP: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel: +55-14-38116239; Fax: +55-14-38113744.

*Corresponding author: e-mail address: marcellapmc@gmail.com

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of infection by parasites of the genus *Babesia* and *Hepatozoon* in 144 domestic cats, through identification by Giemsa stained blood smears and by PCR. The DNA extraction of blood samples was performed using the GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit, according to the manufacturer's instructions. For the realization PCR, the PiroA1 and PiroB primers for *Babesia* spp. and the HepF and HepF primers for *Hepatozoon* spp. were used. Upon examination of blood smears, intra-erythrocytic structures resembling piroplasmida were observed in 5 (3.47%) cats, however, only one was positive by PCR for *Babesia* sp., with a band visualized at 450 bp. The sequencing of this positive sample demonstrated close identity with *Babesia canis vogeli*, already characterized in Brazil. All samples were negative for *Hepatozoon* sp., using blood smears and PCR. The frequency of these

hemoparasites in domestic cats in Brazil is very low and molecular techniques are necessary for the correct diagnosis of these protozoans in these animals.

Key-words: *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon* sp., cats, PCR, hemoprotozoans

Introduction

Among the hemoparasites that can infect domestic cats and are transmitted by ticks, those of major importance are classified as protozoans of the genus *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. and *Hepatozoon* spp. or as gram negative bacteria, such as *Mycoplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. (Shaw et al., 2001).

Various piroplasmids have already been described in felids, such as: *Babesia felis*; *Babesia cati*; *Babesia herpailuri*; *Babesia pantherae*; *Babesia leo*; *Babesia canis* and *Cytauxzoon felis* (Bourdeau, 1996 and Baneth et al., 2004). However, due to their similar intra-erythrocytic stages, the correct identification and the microscopic diagnosis of these parasites is difficult. In Brazil, with the exception of the mycoplasmas, the hemoparasites of cats are not well-known. There exist only a few sporadic reports of unidentified species of piroplasmids (Mendes-de-Almeida et al., 2004); *Ehrlichia* sp. (Almosny et al., 1998) and, recently, of *Hepatozoon* sp. (Perez et al., 2004 and Rubini et al., 2006). Furthermore, reports relating the use of molecular biology in the diagnosis of feline hemoparasites are also very scarce on an international scale.

Material and Methods

An epidemiological study was performed where blood samples were collected from one hundred and forty four (144) domestic cats that resided in São Paulo state and the Federal District between July 2004 and June 2005. The animals had their blood collected by puncturing the jugular vein to investigate cats naturally infected by *Babesia* sp. and *Hepatozoon* sp. through examination of blood smears by optical microscopy and by PCR. All blood smears were fixed with methanol and stained with Giemsa. The EDTA-anticoagulated blood was kept frozen at -80°C until needed for DNA isolation.

The DNA extraction was performed by pre-incubating the blood with proteinase K (digestion) for four hours at 56°C. Afterwards, DNA was isolated from 200 µL aliquots of the blood using a GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech), according to the manufacturer's instructions. Each DNA sample was eluted in 100 µL of UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water. Five microliter portions of these DNA extracts were used for each PCR amplification.

The set of primers, HepF (5' ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC 3') and HepR (5' CTT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG 3'), was designed to amplify a partial 18S rRNA gene sequence of *Hepatozoon* spp. based upon alignment data from *H. canis* (Genbank accession number AF176835), *H. americanum* (AF176836) and *H. catesbiana* (AF176837), as described by Inokuma et al. (2002). The amplification reaction was carried out in a total of 25 µL containing 1X Taq polymerase buffer (Pharmacia), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U of Taq DNA polymerase

(Pharmacia) and 1 μ M of each the primers, HepF and HepR. PCR reactions were performed with the thermal profile consisting of a hot start of 3 min at 94°C and 35 repetitive cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 57°C, and 2 min at 72°C, followed by a 7 min extension at 72°C for one cycle.

For the amplification of the 18S rRNA gene of the *Babesia* species, one pair of oligonucleotides was used: PiroA1 (5' AGG-GAG-CCT-GAG-AGA-CGG-CTA-CC 3') and PiroB (5' TTA-AAT-ACG-AAT-GCC-CCC-AAC 3'). Amplification assays were performed essentially according to Jefferies et al. (2003). The amplification reactions were performed using an initial cycle of 95°C for 5 min, 62°C for 1 min and 72°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 62°C for 20 seconds and 72°C for 30 seconds, with a final extension temperature of 72°C for 7 min.

All amplifications were performed using an automatic Eppendorff® Mastercycler gradient thermocycler. Aliquots of amplified products (8 μ L) were analyzed in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized under an ultraviolet transilluminator. The amplified fragments (450 bp for *Babesia* spp. and 625 bp for *Hepatozoon* spp.) were then sequenced.

Sequencing of PCR products, amplified from cat blood samples, was carried out using an ABI (Applied Biosystems Inc.) automated sequencer. The sequencing and the analysis of nucleic acid sequence data was performed according to Rubini et al. (2006).

Results

According to blood smear examination, intra-erythrocytic structures resembling piroplasmids were observed in 5 (3.47%) cats, however, of the total of 144 samples analyzed, only one (0.9%) was positive for *Babesia* sp. by PCR, with a band visualized at 450 bp (Figure 1). No *Hepatozoon*-positive cats were detected, either by molecular procedures or by microscopy.

The nucleic acid sequence analysis of the positive sample was performed and *Babesia* 18S rDNA sequences were obtained from GenBank for comparison with the amplicon generated in this study. The database sequences, with their GenBank accession numbers in parentheses, included 18S rDNA from *Babesia canis vogeli* Brazil (AY371196), *Babesia canis vogeli* USA (AY371198), *Babesia* sp. Okinawa (AY077719), *Babesia canis vogeli* Egypt (AY371197), *Babesia canis canis* Russia (AY649326), *Babesia canis canis* Europe (AY72926), *Babesia canis rossi* (DQ111760), *Babesia ovis* (AY53346) and *Babesia felis* (AY452707).

The sequencing and phylogenetic analyses of this positive sample demonstrated that the subspecies of *Babesia* isolated from the animal of this study is *Babesia canis vogeli*, with 100% similarity to *B. canis vogeli*, already characterized in Brazil (Passos et al., 2005) (Figure 2). The sequence was identical to the *B. c. vogeli*, previously described in Okinawa, Japan. A single base difference was verified between this isolate and the one identified in the USA and the sequence also showed 99% identity to *B. canis vogeli*, characterized in Egypt. Our sequence was distantly related to *B. felis*.

Discussion

These results indicate that *B. c. vogeli*, a parasite from dogs, can also infect cats. This study represents, to our knowledge, the first demonstration of *Babesia* spp. in cats in Brazil using the PCR technique. Furthermore, this appears to be the first report of feline infections with *B. canis* in the Continent of America.

The fact that *B. canis* can infect cats is not surprising since some authors have pointed out that host specificity of piroplasmids is probably lower than that which had been previously suspected (Navarrete et al., 1999). *Babesia canis* infection in cats is supported by a recent report in which a 395 bp fragment of the 18S rRNA gene was amplified from the blood of two cats from Portugal and one from Spain using a semi-nested PCR (Criado-Fornelio et al., 2003). Another report by Baneth et al. (2004) studied two cats in Israel and the amplification and sequencing of the 18S rRNA gene indicated that infection was caused by *Babesia canis*. However, they proposed to identify this as a new subspecies, *B. canis presentii*.

In this study, using blood smears, we found five cats with intra-erythrocytic structures resembling piroplasmids. According to Penzhorn et al. (2001) and Mendes-de-Almeida et al. (2004), the distinction between *Babesia* spp. and *Cytauxzoon felis* can not be made based only on morphology by microscopic methods. Subsequently, from these five cats, only one was actually infected with *Babesia* sp. by PCR. One of the hypothesis that may justify this result is that the other animals may not have been infected with *Babesia* sp. and the structures found could have been confused with *Mycoplasma haemofelis*; alternatively

precipitation of the stain, Howell-Jolly bodies or basophilic stippling may have occurred, all common occurrences and all with a very similar appearance (Schoeman et al., 2001). A second hypothesis is that the other animals may have been infected with another species of small piroplasmids and the primers used in this study were not capable of amplifying them.

The number of infected animals in the present study (one) was lower than expected and lower than the results obtained in other epidemiological studies. Criado-Fornelio et al. (2003) found *B. c. canis* in 18.7% (3/16) of studied cats and Criado-Fornelio et al. (2004) detected the piroplasmid infection in 5% (5/100) of these animals. On the other hand, 47% (22/47) of cats captured by Mendes-de-Almeida et al. (2004) in Rio de Janeiro were infected with piroplasmids, although their species could not be distinguished between *Babesia* spp. or *Cytauxzoon* spp.

The absence of cats positive for *Hepatozoon* sp. was not expected, since previous reports undertaken in the same region (Perez et al., 2004 and Rubini et al., 2006) related the detection of gamonts and DNA of this parasite in three animals of the same house. The low prevalence found in this study is in agreement with results obtained by Baneth et al. (1998) who detected *Hepatozoon* sp. in 7/1229 domestic cats in Israel, and by Criado-Fornelio et al. (2006) who collected the blood of 330 domestic cats and found only two animals infected with *Hepatozoon* by PCR. In contrast, Jittapalapong et al. (2006) diagnosed this parasite in 32.3% (97/300) of cats studied. A high prevalence of *Hepatozoon* sp. infection was also observed by Kubo et al. (2006), but with different methods from

those previously cited. These authors detected 31.9% (23/72) of parasited animals by histopathological techniques.

Conclusion

In Brazil, few epidemiological studies have been performed to date and the importance of cats as hosts of *B. canis* is still unknown. The clinical, epidemiological and biological significance of the Brazilian isolate should be investigated, and further research is indicated to investigate the tick species responsible for transmission of feline *B. canis*.

The frequency of these hemoparasites in domestic cats in Brazil seems to be very low, but the single positive sample obtained in this study is not sufficient to outline a valid conclusion regarding their real abundance in this country. Molecular techniques are necessary for the correct diagnosis of these hemoparasitosis in these animals.

References

- Almosny, N. R. P.; Almeida, L. E.; Moreira, N. S.; Massard, C. L. 1998. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). Rev. Bras. Cien. Vet. 5, n.2, 82-83.
- Baneth, G.; Aroch, I.; Tal, N.; Harrus, S., 1998. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. Vet. Parasitol. 79, 123-133.
- Baneth, G.; Kenny, M. J.; Tasker, S.; Anug, Y.; Shkap, V.; Levy, A.; Shaw, S. E. 2004. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *Presentii*, in domestic cats. J. Clin. Microbiol. 42, n.1, 99-105.

- Bourdeau, P. Les babésioses félines. 1996. Le Point Veterinaire. 27, n.173, 43-49.
- Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marcos, A.; Buling-Saraña, A.; Barba-Carretero, J. C. 2003. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. Vet. Microbiol. 93: 307-317.
- 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.
- Criado-Fornelio, A.; Ruas, J. L.; Casado, N.; Farias, N. A. R.; Soares, M. P.; Müller, G.; Brum, J. G. W.; Berne, M. E.A.; Buling-Saraña, A.; Barba-Carretero, J. C. 2006. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. J. Parasitol. 92 (1): 93-99.
- Inokuma, H.; Okuda, M.; Ohno, K.; Shimoda, K.; Onishi, T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. Vet. Parasitol. 106, 265-271.
- Jefferies, R.; Ryan, U. M.; Muhinickel, C. J.; Irwin, P. J. 2003. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. J. Parasitol. 89, 409-12.
- Jittapalapong, S.; Rungphisutthipongse, O.; Maruyama, S.; Schaefer, J. J.; Stich, R. W. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1081: 479-488.
- Kubo, M.; Miyoshi, N.; Yasuda, N. 2006. Hepatoonosis in Two Japanese Wild Cat. J. Vet. Med. Sci. 68 (8): 833-837.

- Mendes-De-Almeida, F.; Faria, M. C. F.; Brano, A. S.; Serrão, M. L.; Souza, A. M.; Almosny, N.; Chame, M.; Labarthe, N. 2004. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 46(5): 269-274.
- Navarrete, I.; Nieto, O. 1999. Babesiosis, hepatozoonosis, citauxzoonosis feline. In: Cordero-Del-Campillo, M.; Rojo-Vazquez, F. A., *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, pp.672-678.
- Passos, L. M. F.; Geiger, S. M.; Ribeiro, M. F. B.; Pfister, K.; Zahler-Rinder, M. 2005. First molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 81-5.
- Penzhorn, B. L.; Kjemtrup, A.; Lopez-Rebollar, L.; Conrad, P. A. 2001. *Babesia leo* sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. *J. Parasitol.* 87, 681-685.
- Perez, R. R.; Rubini, A. S.; O`Dwyer, L. H. 2004. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo, Brazil. *Parasitol. Res.* 94, 83-85.
- Rubini, A. S.; Paduan, K. S.; Perez, R. R.; Ribolla, P. E. M.; O`Dwyer, L. H. 2006. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Vet. Parasitol.* 137 (1-2), 168-171.
- Schoeman, T.; Lobetti, R. G.; Jacobson, L. S.; Penzhorn, B. L. 2001. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.* 72(1): 4-11.

Shaw, S. E.; Birtles, R. J.; Day, M. J. 2001. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J. Fel. Med. Surgery.* 3, 193-209.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)