

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)**

**LETICIA MENDES PUIPIO MAIA**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PIROPLASMAS E**  
**HEMOPLASMAS EM GATOS DOMÉSTICOS**  
**NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

**NITERÓI**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LETICIA MENDES PUPIO MAIA**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PIROPLASMAS E  
HEMOPLASMAS EM GATOS DOMÉSTICOS  
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.**

**Orientadores: Prof. Dr. ALOYSIO DE MELLO FIGUEIREDO CERQUEIRA  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY**

**Niterói  
2008**

**LETICIA MENDES PUPIO MAIA**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PIROPLASMAS E  
HEMOPLASMAS EM GATOS DOMÉSTICOS  
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em junho de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. ALOYSIO DE MELLO FIGUEIREDO CERQUEIRA - Orientador**  
Universidade Federal Fluminense

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY - Co-orientadora**  
Universidade Federal Fluminense

---

**Prof. Dr. CARLOS LUIZ MASSARD**  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

**Prof. Dr. ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA**  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

**Niterói**

**2008**

**À eterna Favo de Mel.**

## AGRADECIMENTOS

A todos os felinos (de pequeno e grande porte), em especial a Favo de Mel, Titi, Onofre, Euclides, Flor Marie, Edgar, Sônia e Júlia;

A meus pais, pela vida, amor e valores morais;

A Gabriel Greco, pelo amor, amizade, apoio e tudo mais;

Ao Prof. Dr. Aloysio Cerqueira, meu orientador nesta empreitada, pela confiança, paciência, compreensão e carinho dispensados;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Almosny, minha eterna orientadora, pela “desorientação”, amizade e paciência nestes anos de convivência;

Aos colegas Aline Souza e Daniel Macieira, companheiros de pesquisa em hemoparasitoses de gatos, pelo apoio e colaboração;

Às equipes dos Laboratórios Vet Análises (Rio de Janeiro-RJ) e Vet Lab (Petrópolis-RJ), e às colegas Namir Moreira, Daniela Prado e Iana Oliveira, pelo imprescindível auxílio na obtenção de amostras;

Ao Prof. Dr. Adivaldo da Fonseca (UFRRJ), pelos controles de *C. felis*, bem como à colega Ana Márcia Guimarães (USP) e seu co-orientador, Prof. Dr. Alexander Biondo, pelos controles de hemoplasmas;

Aos amigos que encontrei no Laboratório de Bactérias Enteropatogênicas e Microbiologia de Alimentos da UFF, vulgo LABAC: Cecília Guimarães, Raquel Sant’Anna, Denise Nunes, Matheus Leal, Bruno da Costa Lima, Daniele Pacheco, Flávia Esteves, Renata Ferreira, Sheylla Foligno, Davi Alves da Costa e Guilherme Barandas, por oito meses de trabalho repletos de amizade, companheirismo, alegria e cumplicidade, nos bons e maus momentos;

Aos professores e colegas da Pós e do Laboratório Clínico da UFF;

Às fundações de fomento CNPq, FAPERJ e CAPES, as quais possibilitaram a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As hemoparasitoses contribuem em infecções não diagnosticadas de morbidade e/ou mortalidade das populações de gatos domésticos no Brasil. Este estudo teve como objetivos avaliar: a ocorrência da infecção pelos piroplasmídeos *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp e pelos hemoplasmas *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' em gatos domésticos, a sensibilidade de dois métodos distintos de diagnóstico e os parâmetros hematológicos de animais infectados ou não. Para este estudo foram coletadas amostras de sangue em EDTA de 207 animais provenientes de três diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro, a saber: Metropolitana (n=159), Centro-sul Fluminense (n=37) e Serrana (n=11). Foram selecionados gatos machos e fêmeas, de idades e raças variadas, escolhidos por conveniência. Foram realizados hemogramas e mensuração da concentração de proteínas plasmáticas totais. As amostras de sangue foram submetidas à avaliação por dois métodos de diagnóstico para hemoparasitos: 1) visualização dos parasitos em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa e 2) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para as PCR foram utilizados os iniciadores para as seqüências da porção 18S do RNA ribossomal de *C. felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp, e da porção 16S para *Mycoplasma* spp. As variáveis aferidas nos grupos de estudo foram estatisticamente confrontadas com as do grupo de referência. Apenas dois animais (0,96%; 2/207) apresentavam hemoplasmas em esfregaços sanguíneos, embora 29 amostras (14,0%; 29/207) tenham sido PCR-positivas para esta hemoparasitose ( $p < 0,05$ ). A PCR para *Mycoplasma* spp foi associada à técnica de digestão com enzima de restrição (RFLP-PCR) para determinar a espécie infectante nestas amostras, sendo o número de animais positivos para 'Candidatus *M. haemominutum*' (75,9%; 22/29) numericamente maior que para *M. haemofelis* (24,1%; 7/29). Não foi detectada co-infecção pelas duas espécies de hemoplasmas. Foram observados piroplasmas intraeritrocíticos em um animal (0,48% ou 1/207), confirmado como positivo para *C. felis* pela PCR, e co-infectado com 'Candidatus *M. haemominutum*'. As 207 amostras testadas foram PCR-negativas para os gêneros *Babesia* e *Theileria*. Os parâmetros hematológicos de animais infectados e sadios não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos permitem concluir que a ocorrência de infecções de gatos domésticos por hemoparasitos nas três regiões estudadas do Estado do Rio de Janeiro varia de acordo com as espécies envolvidas, sendo as técnicas moleculares ferramentas importantes para que se realize o diagnóstico específico destas hemoparasitoses. Este é o primeiro relato de infecção natural por *C. felis* em gato doméstico no Brasil, bem como o primeiro diagnóstico molecular, de co-infecção deste parasito com 'Candidatus *M. haemominutum*'.

**Palavras-chave:** Gato, *Cytauxzoon*, *Babesia*, *Theileria*, *Mycoplasma* hemotrópico, hemoplasma, PCR.

## ABSTRACT

Hemoparasites contribute in non diagnosed infections with morbidity and/or mortality of domestic cat populations in Brazil. The present study's objectives were to evaluate: the occurrence of the infection with the piroplasmids *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp and with the hemoplasmas *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in domestic cats, the sensitivity of two distinct diagnostic methods and the hematologic parameters in infected and non-infected animals. A total of 207 blood samples were obtained from three different locations of Rio de Janeiro State: Metropolitana (n=159), Centro-sul Fluminense (n=37) and Serrana (n=11) regions. The population investigated in this study was constituted of male and female domestic cats, of various ages and breeds, conveniently selected. The blood samples were submitted to evaluation by two different diagnostic methods: visualization of parasites in Giemsa stained blood smears and polymerase chain reaction (PCR). Primers to the rRNA 18S sequences of *C. felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp, and to the rRNA 16S sequence of *Mycoplasma* spp were used in PCR. Obtained results in different groups were compared to reference values through statistical analysis. Only two animals (0.96% or 2/207) showed hemoplasmas inclusions on blood smears, although 29 samples (14.0% or 29/207) had a positive result on PCR to this infection agent. *Mycoplasma* spp PCR was associated with *EcoRI* restriction enzyme digestion (RFLP-PCR) to confirm the species responsible for infection on the 29 PCR positive samples, being the infection with 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' (75.9% or 22/29) more frequent than *Mycoplasma haemofelis* infections (24.1% or 7/29). Co-infection by the two hemoplasmas was not detected. Intraerythrocytic piroplasmids were observed in one cat (0.48% or 1/207), confirmed as a *Cytauxzoon felis* positive sample by PCR, in a co-infection with 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. The 207 tested samples were *Babesia* spp and *Theileria* spp negative. The hematologic parameters of infected and healthy animals did not differ statistically ( $p>0.05$ ). The obtained results demonstrated that the occurrence of infection with hemoparasites in domestic cats of the three regions of Rio de Janeiro State varied according to the infecting organism, and that molecular technique is a crucial tool to perform diagnosis of those hemoparasites infection of domestic cats, due to unsatisfactory sensitivity of blood smears examination method. In the same way, the results showed that the hemoplasm infections detected were at subclinic fase, without significant hematologic changes, and that the majority infections were caused by 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. This is the first molecular report of *Cytauxzoon felis* natural infection in a domestic cat in Brazil, as well as the first report of a co-infection of this parasite with 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in veterinary medicine literature.

**Key words:** Cat, *Cytauxzoon*, *Babesia*, *Theileria*, hemotropic *Mycoplasma*, hemoplasm, PCR.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	p. x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	p. xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	p. xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	p. 16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	p. 19
<b>2.1. <i>Cytauxzoon felis</i></b> .....	p. 19
2.1.1 Histórico e etiologia .....	p. 19
2.1.2. Epidemiologia .....	p. 20
2.1.2.1. Distribuição geográfica .....	p. 20
2.1.2.2. Transmissão .....	p. 22
2.1.3. Ciclo biológico .....	p. 24
2.1.4. Aspectos clínicos da doença .....	p. 25
2.1.5 Alterações hematológicas e na bioquímica sérica .....	p. 26
2.1.6. Diagnóstico .....	p. 27
2.1.7. Tratamento .....	p. 29
2.1.8. Prognóstico .....	p. 30
2.1.9. Prevenção .....	p. 31
<b>2.2. <i>Babesia spp</i></b> .....	p. 32
2.2.1 Histórico e etiologia .....	p. 32
2.2.2. Epidemiologia .....	p. 34
2.2.2.1. Distribuição geográfica .....	p. 35
2.2.2.2. Transmissão .....	p. 35
2.2.3. Ciclo biológico .....	p. 36
2.2.4. Aspectos clínicos da doença .....	p. 37
2.2.5 Alterações hematológicas e na bioquímica sérica .....	p. 38
2.2.6. Diagnóstico .....	p. 39
2.2.7. Tratamento .....	p. 40
2.2.8. Prognóstico .....	p. 41
2.2.9. Prevenção .....	p. 41
<b>2.3. <i>Micoplasmas hemotrópicos</i></b> .....	p. 42
2.3.1 Histórico e etiologia .....	p. 42
2.3.2. Epidemiologia .....	p. 46
2.3.2.1. Distribuição geográfica .....	p. 46
2.3.2.2. Transmissão .....	p. 50
2.3.3. Ciclo biológico .....	p. 52
2.3.4. Aspectos clínicos da doença .....	p. 52
2.3.4.1. <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	p. 53
2.3.4.1. ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' .....	p. 54
2.3.4.2. ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ' .....	p. 55
2.3.5 Alterações hematológicas e na bioquímica sérica .....	p. 55
2.3.6. Diagnóstico .....	p. 57
2.3.7. Tratamento .....	p. 59
2.3.8. Prognóstico .....	p. 60
2.3.9. Prevenção .....	p. 60
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	p. 61
<b>3.1. Animais</b> .....	p. 61

<b>3.2. Amostras</b> .....	p. 62
<b>3.3. Processamento das amostras</b> .....	p. 63
3.3.1. Hemogramas .....	p. 63
3.3.2. Extração do DNA genômico .....	p. 64
3.3.3. Ensaio de PCR para amplificação da seqüência genética de <i>Cytauxzoon felis</i> .....	p. 64
3.3.4. Ensaio de PCR “seminested” para amplificação das seqüências genéticas de <i>Babesia</i> spp e <i>Theileria</i> spp .....	p. 64
3.3.5. Ensaio de PCR para amplificação das seqüências genéticas de <i>Mycoplasma haemofelis</i> e ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ .....	p. 65
3.3.6. Controles positivos e negativos das PCR .....	p. 67
3.3.7. Preparo das misturas das PCR .....	p. 67
3.3.8. Condições das PCR .....	p. 68
3.3.9. Visualização dos resultados das PCR .....	p. 69
3.3.10. Digestão de amplicons de <i>Babesia</i> spp/ <i>Theileria</i> spp com enzima de restrição <i>HindIII</i> .....	p. 70
3.3.11. Digestão de amplicons de <i>Mycoplasma</i> spp com enzima de restrição <i>EcoRI</i> .....	p. 70
<b>3.4. Análise estatística</b> .....	p. 71
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	p. 72
<b>4.1. Resultados da pesquisa morfológica da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas</b> .....	p. 73
<b>4.2. Resultados da pesquisa molecular da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas</b> .....	p. 74
4.2.1. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de piroplasmas .....	p. 76
4.2.2. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de hemoplasmas .....	p. 79
4.2.2.1. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	p. 81
4.2.2.2. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ .....	p. 82
<b>4.3. Comparação entre as metodologias de diagnóstico</b> .....	p. 83
<b>4.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos e proteínas plasmáticas totais</b> .....	p. 83
4.4.1. Comparação entre os parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais dos animais positivos e negativos para <i>Cytauxzoon felis</i> por meio de diagnóstico molecular .....	p. 84
4.4.2. Comparação entre parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais dos animais positivos e negativos para <i>Mycoplasma haemofelis</i> por meio de diagnóstico molecular .....	p. 86
4.4.3. Comparação entre parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais dos animais positivos e negativos para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ por meio de diagnóstico molecular .....	p. 89
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	p. 92
<b>6. OBRAS CITADAS</b> .....	p. 94
<b>ANEXOS</b> .....	p. 110
<b>Anexo 1: Valores de referência para os parâmetros hematológicos utilizados neste estudo.</b> .....	p. 111

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1:** Mapa das regiões do Estado do Rio de Janeiro. p. 62
- Figura 2:** Esfregaço sangüíneo com formas intraeritrocíticas de piroplasmas (indicadas por setas) parasitando hemácias de gato. Coloração: Giemsa. Aumento: 1000X. p. 73
- Figura 3:** Esfregaço sangüíneo com formas epieritrocíticas de hemoplasmas (indicadas por setas) parasitando hemácias de gato. Observa-se, também, discreta anisocitose. Coloração: Giemsa. Aumento: 1000X. p. 74
- Figura 4:** Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 18S do RNA ribossomal de *Cytauxzoon felis*. p. 75
- Figura 5:** Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S do RNA ribossomal de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'. p. 75
- Figura 6:** Resultados obtidos a partir da clivagem do produto de amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S do RNA ribossomal de com enzima de restrição *EcoRI*. p. 76

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Classificação taxonômica dos hemoplasmas felinos, vigente até o início da presente década (esquerda) e a nova classificação, instituída após a reclassificação do parasito no táxon. p. 45
- Tabela 2:** Distribuição geográfica e prevalência das infecções por hemoplasmas no sangue de gatos domésticos (compilação de literatura). p. 49
- Tabela 3:** Iniciadores utilizados para a detecção de *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp/*Theileria* spp e hemoplasmas em gatos domésticos, seqüências dos iniciadores, genes-alvo, tamanhos aproximados dos produtos da PCR, número de acesso das seqüências genéticas depositadas no GenBank\* e referências. p. 66
- Tabela 4:** Condições das PCR para *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp, e Hemoplasmas. p. 69
- Tabela 5:** Total de observações absolutas válidas dos parâmetros dos 207 gatos, alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 72
- Tabela 6:** Ocorrência de *Cytauxzoon felis* diagnosticado por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 77
- Tabela 7:** Ocorrência de hemoplasmas diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 79
- Tabela 8:** Ocorrência de infecções por *Mycoplasma haemofelis* diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 81
- Tabela 9:** Ocorrência de animais positivos para 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 82

- Tabela 10:** Distribuição dos parâmetros laboratoriais dos 207 gatos, alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 84
- Tabela 11:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para *Cytauxzoon felis*, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 86
- Tabela 12:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Metropolitana (n=159), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 87
- Tabela 13:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Centro-sul (n=37), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 88
- Tabela 14:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007. p. 89
- Tabela 15:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Metropolitana (n=159), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007. p. 90
- Tabela 16:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Centro-sul (n=37), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007. p. 90
- Tabela 17:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007. p. 91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>χ<sup>2</sup></b>	Qui-quadrado
<b>AIF</b>	Anemia Infecciosa Felina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>CHGM</b>	Concentração de hemoglobina globular média
<b>CID</b>	Coagulação intravascular disseminada
<b>CPDA-1</b>	Citrato-fosfato-dextrose-adenina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNNE</b>	Desvio Nuclear de Neutrófilos à Esquerda
<b>dNTP</b>	Trifosfatos desoxirribonucleosídeos
<b>Dr.</b>	Doutor
<b>Dr.<sup>a</sup></b>	Doutora
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>FeLV</b>	Vírus da leucemia felina
<b>FIV</b>	Vírus da imunodeficiência felina
<b>fL</b>	Fentolitro
<b>g/dL</b>	Gramas por decilitro
<b>GGT</b>	Gama glutamiltransferase
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indireta
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>LE</b>	Leucometria específica
<b>LG</b>	Leucometria global
<b>M</b>	Molar
<b>mg/dL</b>	Miligrama por decilitro
<b>mg/Kg</b>	Miligrama por quilograma
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro cúbico
<b>n<sup>o</sup></b>	Número
<b>p.</b>	Página
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Do inglês "Polymerase Chain Reaction", reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico

<b>PPT</b>	Proteínas plasmáticas totais
<b>PR</b>	Paraná
<b>Prof.</b>	Professor(a)
<b>RFLP</b>	Do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição
<b>RJ</b>	Rio de Janeiro
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rRNA</b>	RNA ribossomal
<b>RT-PCR</b>	Do inglês “real time-PCR”, PCR em tempo real
<b>s</b>	segundos
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SPF</b>	Do inglês “Specific-pathogen-free”
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>U</b>	Unidade internacional de medida
<b>U/L</b>	Unidades por litro
<b>UFF</b>	Universidade Federal Fluminense
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VG</b>	Volume globular
<b>VGM</b>	Volume globular médio
<b>®</b>	Marca registrada
<b>TM</b>	Do inglês “Trade Mark”

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção por hemoparasitos nos animais está associada à morbidade e mortalidade variáveis, de acordo com o parasito envolvido e a espécie doméstica acometida. Grande parte das infecções permanece sem diagnóstico preciso, devido ao fato dos métodos rotineiramente utilizados possuírem baixa sensibilidade e especificidade. São notórios os recentes avanços em Medicina Veterinária, e técnicas até então raramente aplicadas têm sido utilizadas com sucesso, em especial devido a sua crescente demanda. Com o advento do diagnóstico molecular, a reação de polimerase em cadeia (PCR) permitiu que infecções sub-clínicas em animais aparentemente sadios sejam detectadas, possibilitando a identificação da real ocorrência das infecções por hemoparasitos e o impacto destas sobre os parâmetros hematológicos. De acordo com Shaw et al. (2001), organismos não-cultiváveis ou de difícil cultivo *in vitro*, antes deficitariamente identificados, agora são objeto de estudo em todo o mundo.

A citauxzoonose felina é uma doença ainda pouco conhecida no Brasil, tendo sido raramente diagnosticada em nosso país (SOUZA e ALMOSNY, 2002). O agente etiológico desta doença é o protozoário *Cytauxzoon felis*, um piroplasmídeo transmitido por carrapatos ixodídeos. O gato doméstico é considerado o hospedeiro acidental ou final do parasito. Até então, em nosso país, a infecção por *C. felis* foi diagnosticada morfolologicamente e através de técnicas moleculares somente em felídeos selvagens mantidos em cativeiro (PEIXOTO et al., 1999, SCOFIELD, 2002; SOARES, 2002; AMARAL, 2006; PEIXOTO et al., 2007).

Os sinais clínicos desta doença são resultantes principalmente do desenvolvimento de esquizontes em macrófagos, que ocluem a luz de vasos sangüíneos (KIER et al., 1982a; BLOUIN et al., 1987; MEINKOTH, 2001b). Alguns



gatos continuam parasitêmicos mesmo após a cura clínica da doença, e há relatos de animais com parasitemia mesmo sem nunca terem demonstrado sinais clínicos de citauxzoonose (MEINKOTH et al., 2000). A infecção natural por *C. felis simile* em primatas não-humanos no Panamá (SOARES, 2001) sugere a possibilidade de transmissão para seres humanos, especialmente a indivíduos imunocomprometidos, não sendo conhecido o seu potencial zoonótico.

Algumas espécies do gênero *Babesia* spp já foram descritas infectando gatos domésticos (TABOADA e LOBETTI, 2006; YABSLEY et al., 2006). É provável que o protozoário seja transmitido aos gatos por carrapatos ixodídeos, durante o repasto sanguíneo (SHAW et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006). Em gatos com babesiose clínica, o achado hematológico é anemia macrocítica, hipocrômica e regenerativa (SCHOEMAN et al., 2001; BOWMAN et al., 2002; TABOADA e LOBETTI, 2006), que é causada pela hemólise intra e extravascular (SCHOEMAN et al., 2001). Há a possibilidade da manutenção de uma parasitemia persistente, mesmo após o tratamento e a melhora clínica dos sintomas da doença, como ocorre em cães (SHAW et al., 2001).

No Brasil são poucos os relatos de infecção pelo gênero *Babesia* em gatos (O'DWYER e MASSARD, 2002). Piroplasmas foram identificados em esfregaços sangüíneos de gatos domésticos do Rio de Janeiro (ALMOSNY e BOMPET, 1999; SOUZA, 2002; GAZETA et al., 2004) e do interior de São Paulo (PICHOTANO et al., 2004). O DNA de *B. canis vogeli* foi detectado em um gato proveniente de Piracicaba-SP (CARNEIRO, 2007).

Os micoplasmas hemotrópicos, também chamados hemoplasmas, infectam e podem causar doença em gatos domésticos. Acredita-se que a transmissão do organismo ocorra por meio de artrópodes hematófagos, provavelmente pela pulga *Ctenocephalides felis* (WOODS et al., 2005; HARVEY, 2006). A gravidade da doença pode variar entre indivíduos: alguns gatos não apresentam sinais clínicos, enquanto que outros podem desenvolver depressão profunda e anemia acentuada, que podem culminar com o óbito (HARVEY, 2006). De maneira geral, muitos autores consideram que as infecções por *Mycoplasma haemofelis* geralmente produzem anemia e sinais clínicos da doença, enquanto que as por '*Candidatus M. haemominutum*' usualmente são inaparentes, a não ser naqueles casos em que há co-existência com outras doenças/infecções (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; MESSICK, 2004). A anemia é resultante da hemólise tipicamente

extravasular, devido à produção de anticorpos anti-eritrocíticos e anti-hemoplasmas (TASKER e LAPPIN, 2006). Embora o tratamento seja capaz de reduzir a parasitemia e levar a uma melhora clínica, nenhuma terapia foi realmente capaz de eliminar totalmente os organismos (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998, TASKER et al., 2006).

Resultados falso-positivos na visualização dos organismos podem ocorrer quando precipitados de corante, artefatos decorrentes da secagem do esfregaço sangüíneo, corpúsculos de Howell-Jolly, ponteados basofílicos e inclusões siderocíticas são confundidas com *C. felis*, *Babesia* spp ou hemoplasmas (SCHOEMAN et al., 2001; GREENE et al., 2006; HARVEY, 2006; TABOADA e LOBETTI, 2006). Não obstante, não é possível diferenciar inclusões intraeritrocíticas de pequenas *Babesia* spp e *C. felis* (HOOVER et al., 1994; KIER et al., 1987; MEINKOTH e KOCAN, 2005; UILENBERG, 2006; YABSLEY et al., 2006).

Resultados falso-negativos são ainda mais comuns, ocorrendo devido à baixa sensibilidade do método de avaliação do esfregaço sangüíneo e ao pequeno grau de parasitemia presente em muitos casos (WAGNER, 1976; WAGNER et al., 1976, 1980; SIMPSON et al., 1985b; GAUNT, 2000; SHAW et al., 2001; WESTFALL et al., 2001; SCOFIELD, 2002; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; HARVEY, 2006).

Esta dificuldade no diagnóstico faz necessária a implementação de técnicas moleculares que permitam determinar o agente etiológico envolvido, além de possibilitar estudos sobre a epidemiologia, patogenia, sintomatologia, tratamento e o prognóstico para cada uma destas hemoparasitoses.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência da infecção pelos piroplasmas *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp, *Theileria* spp, e pelos hemoplasmas *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' em gatos domésticos de três regiões do Estado do Rio de Janeiro (Metropolitana, Centro-sul e Serrana), a sensibilidade de dois métodos distintos de diagnóstico e a correlação entre o resultado PCR-positivo e possíveis alterações hematológicas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Cytauxzoon felis*

#### 2.1.1. Histórico e etiologia

A palavra *Cytauxzoon* é originada do grego: *kytos* significa célula; *auxē*, aumento e *zoon*, animal (NEITZ e THOMAS, 1948). Taxonomicamente, *Cytauxzoon* spp está compreendido dentro do Reino Protista, no Sub-Reino Protozoa, cujos organismos são unicelulares eucariotas, providos de núcleo diferenciado e de outras organelas membranosas. São protozoários parasitos do Filo Apicomplexa, dentro do qual estão presentes protozoas dotados de complexo apical, importante na fixação e invasão de células do hospedeiro. Por fim, encontram-se classificados como parasitos da Classe Piroplasmidia e na Família Theileriidae (REY, 2002).

Os membros da Família Theileriidae possuem um ciclo biológico composto por uma fase de esquizogonia tecidual e por outra intraeritrocítica em seus hospedeiros mamíferos. O gênero *Cytauxzoon* foi designado para as espécies nas quais a fase tecidual desenvolve-se em células retículo-endoteliais, endoteliais, histiócitos ou macrófagos. Já as espécies do gênero *Theileria* invadem os linfócitos para realizar esquizogonia (KIER et al., 1987). A classificação dos piroplasmas foi feita de acordo com características microscópicas e ultraestruturais, além de observações sobre o seu ciclo biológico. Com o advento de técnicas de caracterização molecular, novos gêneros, espécies e variantes têm sido descobertos, com constantes propostas para reorganizações taxonômicas (ALLSOPP et al., 1994).

## 2.1.2. Epidemiologia

### 2.1.2.1. Distribuição geográfica

*Cytauxzoon felis* foi descrito pela primeira vez em gatos domésticos (*Felis catus* Linnaeus, 1775) na região sudoeste do Missouri, EUA, por Wagner (1976). Glenn et al. (1982) descreveram formas intraeritrocíticas semelhantes às de *C. felis* em lince (*Lynx rufus* Schreber, 1777) de vida-livre, sugerindo a associação entre estas inclusões e a infecção por um parasito do gênero *Babesia*.

Formas semelhantes às de *Cytauxzoon* sp também foram estudadas em felídeos silvestres. De acordo com Zinkl e McDonald (1981), dois guepardos (*Acinonyx jubatus* Schreber, 1775) assintomáticos, mantidos em cativeiro na Califórnia, EUA, apresentaram organismos detectados através da realização de esfregaços sanguíneos. A inoculação destas amostras em gatos domésticos, contudo, não foi capaz de produzir citauxzoonose, não tendo sido observadas inclusões intraeritrocitárias no sangue destes animais. Por estes motivos, levando-se em consideração esta especificidade e a delicada relação entre o parasito e o hospedeiro, os autores sugeriram que este piroplasmídeo se tratava de uma outra espécie do gênero *Cytauxzoon* sp, que não *C. felis*.

Em 1984, um filhote de tigre-de-bengala (*Panthera tigris* Linnaeus, 1758) de 18 semanas de vida, fêmea, nascido em um zoológico na Alemanha, adoeceu subitamente, apresentando sinais clínicos inespecíficos como anorexia, letargia e dispnéia. O animal veio ao óbito, e o estudo histopatológico retrospectivo revelou formas semelhantes a merozoítas no citoplasma de macrófagos, na luz ou circundando os vasos sanguíneos de linfonodos, baço, pulmões, fígado, rins, coração, intestinos, cérebro, leptomeninge e medula óssea. Ao microscópio eletrônico, foram observados diversos estágios de desenvolvimento de *Cytauxzoon* sp. no interior do citoplasma de macrófagos intra e perivasculares, além de piroplasmas no interior de eritrócitos (JAKOB e WESEMEIER, 1996).

O desenvolvimento da forma fatal da doença foi relatado em um tigre branco (*Panthera tigris* Linnaeus, 1758) fêmea, de sete anos, nascido em um cativeiro no Estado da Flórida, EUA (GARNER et al., 1996). Como achados, foram destacados sinais e sintomas semelhantes aos apresentados por gatos domésticos acometidos,

piroplasmas em 5% dos eritrócitos circulantes, e esquizontes em macrófagos intravasculares, ocluindo parcial ou totalmente vasos sanguíneos nos pulmões, baço, fígado e medula óssea (GARNER et al., 1996).

A citauxzoonose por *C. felis* foi descrita em duas sub-espécies de puma: a pantera da Flórida (*Puma concolor coryi* Bangs, 1899) e o cougar do Texas (*Puma concolor stanleyana* Goldman, 1938) (ROTSTEIN et al., 1999). Este estudo, ao avaliar a prevalência de *C. felis* nestas duas populações de felídeos de vida-livre no estado da Flórida, revelou que 39% das panteras da Flórida e 35% dos cougars do Texas estavam infectados por *C. felis* (ROTSTEIN et al., 1999). De acordo com estes autores, comparando-se os valores hematológicos de animais infectados e não-infectados, concluiu-se que a citauxzoonose não pareceu exercer efeitos negativos sobre os parâmetros hematológicos destes felídeos portadores de infecção crônica por *C. felis*.

Foram observados pequenos piroplasmas intraeritrocíticos em quatro gatos-de-Pallas (*Otocolobus manul* Pallas, 1776) de vida-livre, originários da Mongólia, capturados e transportados diretamente para o Estado de Oklahoma, EUA (KETZ-RILEY et al., 2003). Estes animais apresentavam os parâmetros hematológicos dentro dos valores de normalidade para a espécie e uma parasitemia menor que 1%. Na tentativa de caracterizar o piroplasma em questão, foi realizada a amplificação do gene da menor subunidade do RNA ribossomal (18S) deste microrganismo pela técnica de PCR. A análise filogenética sugeriu que o parasito não pertence à espécie *C. felis*, mas a uma espécie diferente de *Cytauxzoon* (KETZ-RILEY et al., 2003). Em 2005, Reichard et al. realizaram um estudo filogenético demonstrando uma divergência seqüencial no DNA (1,490%) entre *C. felis* e o parasito encontrado nos gatos-de-Pallas, o que levou estes pesquisadores a propor a denominação *C. manul* para esta nova espécie.

Segundo Millán et al. (2007), o lince ibérico (*Lynx pardinus*) é considerado a espécie de felídeo mais ameaçada de extinção no mundo. Atualmente, existem apenas 160 indivíduos, os quais vivem separados em duas meta-populações no sul da Espanha. Estes autores verificaram que 15% destes animais (3/20) encontravam-se infectados por, no mínimo, duas espécies do gênero *Cytauxzoon*.

A citauxzoonose felina é uma doença ainda pouco conhecida no Brasil, tendo sido raramente diagnosticada em nosso país (SOUZA e ALMOSNY, 2002). O primeiro diagnóstico da infecção por *Cytauxzoon* sp. no Brasil ocorreu em 1999,

quando foi identificado através de hematoscopia e histopatologia em dois leões (*Panthera leo* Linnaeus, 1758) mantidos em um zoológico em Volta Redonda-RJ (PEIXOTO et al., 1999; 2007). Inúmeros esquizontes foram visualizados no interior de macrófagos, ocluindo parcial ou totalmente a luz de capilares, vênulas e arteríolas de diversos órgãos. A infecção natural também foi detectada *in vivo* em uma onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) e em um gato-do-mato pequeno (*Felis tigrina* Schereber, 1775), através de avaliação hematoscópica, na qual foram visualizadas formas intraeritrocíticas típicas de *C. felis* (SCOFIELD, 2002; SOARES, 2002). As análises fenotípica e filogenética do gene 18S do RNA ribossomal do parasito presente nestas amostras revelaram-se 99% similares ao mesmo gene da espécie *C. felis* originária dos EUA. Graus um pouco menores foram obtidos frente à comparação com a espécie *C. felis* originária da Espanha e com *C. manul*, originária da Mongólia (AMARAL, 2006).

Em um estudo sobre as hemoparasitoses de gatos domésticos residentes no zoológico da cidade do Rio de Janeiro, a avaliação hematoscópica revelou que 47% apresentavam inclusões parasitárias, cujo diagnóstico diferencial entre *Babesia* sp. e *Cytauxzoon* sp. não foi realizado (SOUZA, 2002). Pichotano et al. (2004) diagnosticaram piroplasmas no interior de eritrócitos de um gato doméstico do interior de São Paulo. Estes autores afirmaram com base apenas na avaliação hematoscópica que o parasito em questão pertencia ao gênero *Cytauxzoon*.

Soares (2002) obteve sucesso na infecção experimental de gatos domésticos ao inocular o sangue dos felídeos silvestres do zoológico de Volta Redonda-RJ diagnosticados positivos através da visualização de piroplasmas em esfregaços sangüíneos. Ao utilizar o sangue de um gato infectado experimentalmente por Soares (2002) como inóculo, Amaral (2006) multiplicou o isolado de *C. felis* em dois gatos domésticos imunossuprimidos com dexametasona.

Não foi encontrado na literatura relato envolvendo o diagnóstico molecular da infecção natural por *C. felis* em gatos domésticos no Brasil.

#### 2.1.2.2. Transmissão

O protozoário *Cytauxzoon* sp. é transmitido naturalmente através de carrapatos ixodídeos, sendo a espécie *Dermacentor variabilis* Say, 1821 o único

vetor até então reconhecido (SHINDEL et al., 1978; GLENN et al., 1983; GLENN e STAIR, 1984; SIMPSON et al., 1985a, 1985b; KIER et al., 1987; COWELL et al., 1988a, 1988b; HOOVER et al., 1994; GARNER et al., 1996; GAUNT, 2000; MEINKOTH, 2001a, 2001b; VERDON, 2002), embora outras espécies de carrapatos como o *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758 possam estar envolvidas (BONDY JR et al., 2005). Geralmente, os gatos domésticos se infectam nos meses de verão, devido ao ciclo biológico do hospedeiro invertebrado estar sendo favorecido nesta estação (WAGNER et al., 1980; KIER et al., 1982a; BLOUIN et al., 1987; KIER et al., 1987). Há, ainda, transmissão por via transplacentária (MEINKOTH, 2001a) e iatrogênica, seja por transfusão sanguínea ou inoculação de tecidos parasitados (SHINDEL et al., 1978; GLENN et al., 1982; KIER et al., 1982a, 1982b; GLENN e STAIR, 1984; SIMPSON, et al., 1985a, 1985b; KIER et al., 1987; HOOVER et al., 1994; GARNER et al., 1996; GAUNT, 2000; MEINKOTH, 2001a, 2001b; REINE, 2004).

O gato doméstico vinha sendo considerado o hospedeiro acidental ou final de *C. felis*, devido ao curso rápido e fatal da doença decorrente da infecção (KIER et al., 1982b; GLENN et al., 1984; FRANKS et al., 1988). Historicamente, a mortalidade para a espécie é alta, tanto em gatos que recebem tratamento quanto naqueles que não o recebem (WAGNER, 1976; HOOVER et al., 1994; WALKER e COWELL, 1995; MEINKOTH, 2001b). O lince (*Linx rufus* Kerr, 1792), por sua vez, é tido como hospedeiro assintomático e reservatório natural de *C. felis* (GLENN et al., 1982; KIER et al., 1982b; GLENN et al., 1983). Contudo, alguns lincezes de vida-livre podem vir ao óbito devido à citauxzoonose, conforme relatado por Nietfeld e Pollock (2002), onde os achados clínicos e patológicos foram semelhantes aos observados na infecção experimental em gatos. A maioria dos lincezes acometidos pela doença apresenta apenas uma parasitemia crônica, sem evidência de sinais clínicos (BLOUIN et al., 1984). Tratam-se, desta forma, de uma importante fonte de infecção aos carrapatos. Estes, por sua vez, propagam a doença a outros felídeos, dentre eles o gato doméstico.

O período de incubação relatado em infecções experimentais varia de cinco a 20 dias (WAGNER et al., 1980; KIER et al., 1987; FRANKS et al., 1988). Os gatos podem vir ao óbito de sete a dez dias após a infecção devido à anemia, trombocitopenia e a doenças relacionadas à formação de complexos imunes (COWELL et al., 1988b; BUTT et al., 1991). Contudo, o fator determinante para a

fatalidade da doença, tanto em gatos domésticos como em lincês, é o desenvolvimento de esquizontes em macrófagos, o que se acredita ser mais importante que a parasitemia propriamente dita (KIER et al., 1982a; BLOUIN et al., 1987; MEINKOTH, 2001b).

O gênero *Cytauxzoon* foi criado quando da descrição da espécie *C. sylvicaprae* em um bambi comum (*Sylvicapra grimmia* Linnaeus, 1758), por Neitz e Thomas (1948) na África do Sul. Os autores detalharam a sintomatologia e as alterações patológicas da doença produzida pelo parasito, descrevendo seu ciclo de vida. Observaram, ainda, que o protozoário realiza divisões binárias no interior das hemácias e uma multiplicação por esquizogonia em histiócitos. Outras espécies de *Cytauxzoon* foram descritas em ungulados africanos: *C. strepsicerosi* (Neitz e De Lange, 1956, citado por NEITZ, 1957) no kudu (*Tragelaphus strepsiceros* Pallas, 1766) por Neitz (1957); *C. taurotragi* (Martin e Brocklesby, 1960) no elande (*Taurotragus oryx pattersonianus* Lydekker, 1906) por Brocklesby (1962); e, por fim, *Cytauxzoon* sp em uma girafa (*Giraffa camelopardalis* Linnaeus, 1758) por McCully et al. (1970).

O potencial zoonótico da citauxzoonose ainda não é conhecido. Entretanto, foi observada a infecção natural por *C. felis simile* em primatas não-humanos no Panamá (SOARES, 2001), o que sugere a possibilidade de transmissão para seres humanos, especialmente a indivíduos imunocomprometidos.

### 2.1.3. Ciclo biológico

Conforme anteriormente citado, o ciclo biológico natural de *C. felis* envolve o ectoparasitismo por carrapatos ixodídeos. O carrapato, durante o repasto sanguíneo, inocula as formas esporozoítas no hospedeiro, as quais penetram em fagócitos mononucleares, ou histiócitos (KOCAN et al., 1992). Nestas células, as replicações por esquizogonia e fissão binária causam um aumento do volume celular, que leva à oclusão da luz de vasos sanguíneos. Os merozoítas ingurgitam as células, até que elas se rompem, liberando-os na circulação (SIMPSON et al., 1985a). Uma vez livres no sangue, as formas merozoítas penetram em eritrócitos circulantes por endocitose, sem que haja o rompimento de sua membrana celular. Nestes, replicam-



se por fissão binária e originam trofozoítas, os quais são capazes de infectar outros eritrócitos (KOCAN et al., 1992).

Os eritrócitos circulantes parasitados são ingeridos pelo carrapato, sendo os parasitos liberados em seu intestino. Diferenciam-se em macro e microgamontes, os quais se unem para formar o zigoto (reprodução sexuada). Este se diferencia em oocineto, que se multiplica por reprodução assexuada, penetra na parede intestinal e migra para as glândulas salivares. Através de reprodução assexuada por merogonia, ocorre o brotamento de organismos a partir da superfície celular destas células glandulares. Formas infectantes do parasito, presentes na saliva do hospedeiro invertebrado, são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (MEHLHORN e SCHEIN, 1984).

#### 2.1.4. Aspectos clínicos da doença

Historicamente, a mortalidade para a espécie felina é alta, tanto em gatos que recebem tratamento quanto naqueles que não o recebem (WAGNER, 1976; HOOVER et al., 1994; WALKER e COWELL, 1995; MEINKOTH, 2001b).

Os sinais e sintomas observados em gatos domésticos com piroplasmas (em geral) no interior de eritrócitos circulantes são: anorexia, depressão, febre alta, desidratação, icterícia, dispnéia, sensibilidade à palpação abdominal e esplenomegalia. O hemograma destes animais é caracterizado por anemia acompanhada de leucopenia com linfopenia (WAGNER, 1976; WAGNER et al., 1980; ZINKL e MCDONALD, 1981; KIER et al., 1982a; GLEEN e STAIR, 1984; KIER et al., 1987; HOOVER et al., 1994; WALKER e COWELL, 1995; GARNER et al., 1996; JAKOB e WESEMEIER, 1996; GREENE et al., 1999; MEINKOTH, 2001b; CRYSTAL, 2004). Conforme previamente citado, a maioria dos sinais clínicos na citauxzoonose se deve à infiltração de macrófagos infectados com esquizontes em vários tecidos, e não ao parasitismo dos eritrócitos (KIER et al., 1982a; BLOUIN et al., 1987; MEINKOTH, 2001b).

Walker et al. (1995) relataram a ocorrência de citauxzoonose em um gato doméstico, fêmea, de um ano de idade, o qual sobreviveu à doença. O tratamento emergencial instituído foi antibioticoterapia com enrofloxacin por via subcutânea e fluidoterapia intravenosa de soro ringer com lactato, seguido de tetraciclina por via

oral. O hemograma do animal indicava leucopenia leve, trombocitose e anemia regenerativa com policromasia. Foram observados piroplasmas intra-eritrocitários com formato freqüente de sineta e raras tétrades, compatíveis com as formas de *C. felis*, em aproximadamente 5% dos eritrócitos. A policromasia eritrocítica moderada e a trombocitose discreta observadas não são típicas de citauxzoonose. Tratam-se, contudo, de indicativos de uma resposta medular eritropoiética do paciente à anemia, embora não se saiba o fator determinante responsável pela sobrevivência do animal frente à doença (WALKER et al., 1995).

Em um relato sobre gatos domésticos que sobreviveram à infecção natural por *C. felis*, a maioria apresentava anorexia, desidratação e febre alta, sinais clínicos comuns da doença, enquanto que em um menor número de animais foi evidenciada anemia ou icterícia (MEINKOTH et al., 2000).

#### 2.1.5 Alterações hematológicas e na bioquímica sérica

As alterações hematológicas mais freqüentemente observadas são anemia normocítica normocrômica leve a moderada, que pode ser regenerativa ou arregenerativa, além de leucopenia, acompanhada ou não por desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (DNNE) e trombocitopenia. Estas alterações podem ocorrer sozinhas ou em diferentes combinações. Os animais podem apresentar uma leucopenia acentuada, a qual é observada mais comumente em estágios avançados da doença (KOCAN et al., 1985; HOOVER et al., 1994; GARNER et al., 1996; ROTSTEIN et al., 1999; CRYSTAL, 2004).

Quanto à bioquímica sérica, a alteração mais comum é a hiperbilirrubinemia, podendo ocorrer, também, a diminuição da concentração sérica de albumina e o aumento da concentração de proteínas plasmáticas totais, glicose e transaminases hepáticas (KOCAN et al., 1985; HOOVER et al., 1994; GARNER et al., 1996; ROTSTEIN et al., 1999; CRYSTAL, 2004). A concentração sérica de uréia pode variar de aumentada (azotemia pré-renal) a dentro dos valores de referência. Esta azotemia pré-renal pode ser explicada pela intensa desidratação e também pela diminuição dos níveis albumina sérica que geralmente ocorrem em gatos com citauxzoonose (HAUCK, 1982).

### 2.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico clínico de hemoparasitoses pode ser dificultado devido à relativa inespecificidade dos sinais e sintomas observados. Perda de peso, anorexia, depressão, fraqueza, febre, hipotermia (e conseqüente choque), dores articulares, hiperestesia, esplenomegalia e anemia regenerativa foram relatadas em animais domésticos que apresentavam hemoparasitoses (COLES, 1986; TILLEY e SMITH, 1997; MEYER e HARVEY, 1998; ALMOSNY, 2002).

O diagnóstico de hemoparasitoses através de sua visualização em esfregaços sanguíneos por microscopia óptica tem sido realizado rotineiramente, embora somente um pequeno número de animais infectados apresente parasitos circulantes. Apenas parasitemias cujos eritrócitos parasitados excedam  $10^3$  por  $\mu\text{L}$  de sangue (ou 0,1%) podem ser consideradas detectáveis através da hematoscopia (GAUNT, 2000), sendo que a porcentagem de hemácias parasitadas por piroplasmas geralmente é baixa (MEIER e MOORE, 2000). A parasitemia por *C. felis* varia entre 0,5 e 5%, e, na maioria das infecções naturais relatadas, este grau é de 1%, em média (WAGNER, 1976; WAGNER et al., 1976, 1980; SIMPSON et al., 1985b; SCOFIELD, 2002). As formas intraeritrocíticas podem se evidenciadas em apenas 50% dos casos de citauxzoonose fatal em gatos, tanto em infecções naturais quanto nas experimentais (KIER et al., 1987). Episódios febris tendem a coincidir com o aumento da parasitemia, como foi observado por Franks et al. (1987), sendo interessante que sejam confeccionados esfregaços sanguíneos nestes momentos. Em caso de suspeita de citauxzoonose, o ideal é que se realizem diversos esfregaços sanguíneos seriados em dias consecutivos (HAUCK, 1982). As formas intraeritrocitárias de *C. felis* visualizadas por microscopia óptica podem ser confundidas com as do hemoparásita *Babesia felis*, uma vez que estes dois gêneros são indistinguíveis morfológicamente (KIER et al., 1987; HOOVER et al., 1994; MEINKOTH e KOCAN, 2005; UILENBERG, 2006).

Os piroplasmas intraeritrocitários de *C. felis*, quando observados pelo método de microscopia óptica, podem se apresentar de diversas formas: de arredondados à ovalados, anaplasmoídes puntiformes ou piriformes, alongados, em forma de sineta ou de téttrade. Seu tamanho pode variar entre 0,5 e 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo formas medindo de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro as mais freqüentes. Podem ser

visualizados como um único organismo ou em cadeias, sendo mais usualmente encontrados até dois trofozoítas por eritrócito, e eventualmente três a quatro, que assumem a forma de cruz-de-Malta. Em esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa, pode-se evidenciar a presença de um núcleo pequeno e periférico, corado em vermelho escuro a roxo; o citoplasma é corado em tons de azul claro (WAGNER, 1976; GLENN e STAIR, 1984; SIMPSON et al., 1985b; KIER et al., 1987; COWELL et al., 1988b; SCOFIELD, 2002).

Os esquizontes são pleomórficos e de formas predominantemente arredondadas, cujos diâmetros variam entre 15 a 250 µm. Podem ser observados no citoplasma das células retículo-endoteliais e macrófagos de vasos sanguíneos de diversos órgãos, como baço, linfonodos, pulmões, fígado, rins, coração, bexiga urinária e medula óssea. No interior destas células pode-se indentificar um grande número de formas merozoítas em diversos estágios de replicação (WAGNER, 1976; WAGNER et al., 1976; KIER et al., 1987; PEIXOTO et al., 1999; SOARES, 2002). A maioria dos esquizontes é relativamente amorfa e basofílica (quando do uso da coloração Hematoxilina-Eosina), ocupando quase todo o citoplasma das células parasitadas (WAGNER, 1976).

Shindel et al. (1978) desenvolveram um teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a detecção de microrganismos morfologicamente semelhantes ao *Cytauxzoon* sp. em tecido esplênico de gatos infectados experimentalmente. A distribuição da fluorescência correspondeu à aparência de células retículo-endoteliais parasitadas em cortes histológicos do baço. Outro trabalho utilizou a detecção de anticorpos (IgG) por ensaio microfluorométrico para esquizontes de *Cytauxzoon* sp., com o objetivo de estabelecer um teste para diagnóstico em gatos experimentalmente infectados com parasitas originados de lincas (COWELL et al., 1988a). O uso de métodos sorológicos para o diagnóstico da citauxzoonose é controverso, pois nem todos os gatos infectados desenvolvem títulos de anticorpos detectáveis antes de virem ao óbito (COWELL et al., 1988a). Ainda, aqueles gatos que apresentam anticorpos tendem a ter títulos baixos, os quais surgem tardiamente, dificultam o diagnóstico e são insuficientes para a cura espontânea da doença (COWELL et al., 1988a).

Dados obtidos através de estudos filogenéticos e ecológicos dos microrganismos foram utilizados para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular, além de pesquisas sobre a natureza e o controle de patógenos (OLSEN

et al., 1994). Todavia, ainda não há diagnóstico molecular disponível comercialmente para *Cytauxzoon* spp., o que dificulta ainda mais a determinação da real prevalência deste parasito em diferentes populações e espécies de felídeos, em especial naqueles imunodeprimidos por ocasião de doenças concomitantes endêmicas. Podemos destacar, dentre elas, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o da leucemia felina (FeLV). Mendes-de-Almeida et al. (2004) não detectaram influência da presença de anticorpos contra FIV sobre a prevalência da infecção por piroplasmídeos. Todavia, não foi realizada a diferenciação entre os possíveis gêneros envolvidos (*Babesia* sp. e *Cytauxzoon* sp.); sabe-se que o diagnóstico através da visualização de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos é menos sensível e específica que técnicas moleculares (GAUNT, 2000; MEIER e MOORE, 2000).

A dificuldade no diagnóstico de infecção por piroplasmas através da visualização e de exames sorológicos pode ser contornada com o uso de técnicas moleculares. Desta forma, torna-se possível estudar a espécie de piroplasmídeo, determinando sua epidemiologia, patogenia, sintomatologia, formas adequadas de tratamento e prognóstico para cada infecção (CRIADO-FORNELIO et al., 2003, 2004).

#### 2.1.7. Tratamento

Conforme previamente abordado, há na literatura um caso de citauxzoonose felina em que o tratamento instituído, basicamente de suporte, foi composto por fluidoterapia intravenosa de soro ringer com lactato e administração subcutânea de enrofloxacin durante dez dias, seguido por antibioticoterapia com tetraciclina por via oral durante cinco dias (WALKER et al., 1995).

A enrofloxacin e a tetraciclina pertencem à classe das fluoroquinolonas e tetraciclinas, respectivamente, sendo consideradas antibióticos bactericidas de amplo espectro. O mecanismo de ação da enrofloxacin é inibir a DNA-girase bacteriana, enquanto que a ação da tetraciclina se dá através da inibição da síntese proteica bacteriana (SPINOSA et al., 2006). Em altas doses, a tetraciclina possui alguma atividade contra protozoários (HUBER, 1992). Todavia, não há qualquer relato sobre a eficácia no tratamento de infecção por protozoários em gatos. Não

obstante, muitos outros felinos com *Cytauxzoon* recebendo tratamento semelhante vieram ao óbito (GREENE et al., 2006). Em seu trabalho, Walker et al. (1995) se indagaram sobre os fatores determinantes para a sobrevivência do animal, e concluem que, possivelmente, fatores relacionados à interação entre o parasito e o hospedeiro podem ter sido determinantes para o desfecho favorável.

Em estudo conduzido por Greene et al. (1999), o tratamento composto pela administração de: aceturato de diaminazeno ou dipropionato de imidocarb (2,0mg/kg) por via intramuscular, em duas aplicações com intervalo de três a sete dias, fluidoterapia parenteral (via subcutânea ou intravenosa), administração de heparina por via subcutânea (100 a 150 UI/kg, a cada oito horas) e transfusões sanguíneas obteve sucesso em alguns dos gatos infectados por *C. felis* (GREENE et al., 1999).

O dipropionato de imidocarb e o diminazeno são diamidinas aromáticas que se ligam ao DNA do cinetoplasto do parasito em sítios ricos em pares de bases adenina-tiamidina, inibindo a replicação do DNA, e, possivelmente, a topoisomerase mitocondrial tipo II (McDOUGALD e ROBERSON, 1992; SPINOSA et al., 2006). Em infecções experimentais, o tratamento com dipropionato de imidocarb se mostrou ineficiente (MEINKOTH et al., 2000). O diminazeno deve ser utilizado com administração prévia do sulfato de atropina (na dose de 0,05mg/kg), cuja função é prevenir efeitos colaterais colinérgicos indesejáveis (MEINKOTH et al., 2000).

O uso de heparina justifica-se devido à suspeita de que a trombocitopenia observada na doença seja resultado de um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID). O hematócrito e a temperatura corporal devem se monitorados com cuidado, e a hemoterapia instituída naqueles casos com anemia acentuada ou hemólise pós-tratamento (GREENE et al., 1999).

#### 2.1.8. Prognóstico

O prognóstico para felídeos silvestres infectados por *Cytauxzoon* sp. é favorável, a não ser em casos específicos, considerados como exceções à regra (KIER et al., 1982b; BLOUIN et al., 1987; NIETFELD e POLLOCK, 2002).

Por outro lado, o prognóstico para um gato infectado por *C. felis* é considerado de desfavorável a reservado, pois, historicamente, sua taxa de

mortalidade é alta, independente da instituição de tratamento considerado adequado (WAGNER, 1976; HOOVER et al., 1994; WALKER e COWELL, 1995; MEINKOTH, 2001b; MEINKOTH e KOCAN, 2005). A dificuldade em se realizar um diagnóstico ao surgimento dos primeiros sinais e sintomas torna este prognóstico ainda mais sombrio, pois o tratamento muitas vezes é instituído naquelas situações em que o quadro já está adiantado. O fato das doses dos medicamentos que objetivam neutralizar os protozoários ainda não terem sido completamente estabelecidas em felinos faz com que haja uma linha tênue entre o tratamento eficaz e uma intoxicação iatrogênica. Todavia, diante de um diagnóstico precoce, o uso de medicamentos anti-protozoários associados ao tratamento de suporte permite que poucos gatos consigam se recuperar da citauxzoonose (CRYSTAL, 2004).

Além disso, há alguns relatos de gatos domésticos que sobreviveram a infecções por *C. felis* (KIER et al., 1982; WALKER e COWELL, 1995; GREENE et al., 1999; MEINKOTH et al., 2000; BIRKENHEUER et al., 2006b). Alguns destes animais permaneceram com parasitemia mesmo após a cura clínica da doença (MEINKOTH et al., 2000). Há gatos que se mantêm parasitêmicos mesmo sem nunca terem demonstrado sinais clínicos da doença (MEINKOTH et al., 2000). Somando-se isto à dinâmica social de gatos que têm livre acesso a áreas em que podem estar expostos a carrapatos, Haber et al. (2007) sugeriram que estes animais também poderiam servir como um hospedeiro-reservatório para *C. felis*, o que seria capaz de contribuir para o aparente e recente aumento da distribuição geográfica do hemoparasito nos EUA.

#### 2.1.9. Prevenção

Ao considerar a via de transmissão da citauxzoonose, é indicado manter um controle eficaz de ectoparasitas, além de evitar que o gato tenha acesso a ambientes externos (MEINKOTH e KOCAN, 2005; GREENE et al., 2006). Através de técnicas de biologia molecular é possível identificar possíveis reservatórios da doença, sendo interessante que gatos doadores de sangue tenham resultado negativo na PCR para *Cytauxzoon* sp. (REINE, 2004).

## 2.2. *Babesia* sp.

### 2.2.1. Histórico e etiologia

A denominação do gênero *Babesia* foi sugerida em homenagem a Dr. Victor Babés, pesquisador que, em 1888, investigava a causa de hemoglobinúria em bovinos na Romênia. Este pesquisador observou em esfregaços sangüíneos destes animais pequenos organismos intraeritrocíticos, os quais foram denominados de *Haematococcus bovis*. O parasito foi renomeado em 1893 por Starcovici, adotando, por esta razão, o nome *B. bovis* (Starcovici, 1893 apud UILEMBERG, 2006).

Assim como *Cytauxzoon*, o gênero *Babesia* e suas espécies estão taxonomicamente compreendidos dentro do Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Apicomplexa e Classe Piroplasmidia. Enquanto *Cytauxzoon* sp. está alocado na Família Theileriidae, o gênero *Babesia* spp encontra-se na Família Babesiidae. Algumas designações foram utilizadas no passado com o intuito de descrever este protozoário, tais como *Babesiella* sp., *Nuttallia* sp. e *Nicolliia* sp. Atualmente, o gênero *Babesia* é o único aceito para a família Babesiidae, englobando estas espécies (BOWMAN et al., 2002).

Grandes e pequenos piroplasmas já foram descritos como *Babesia* spp em felídeos selvagens; alguns destes mostraram-se infectantes para gatos domésticos. Sua nomenclatura é confusa, sendo que a maioria dos parasitos foi nomeada de acordo com o hospedeiro em que se realizava o diagnóstico, sem que fosse estudada sua especificidade (UILEMBERG, 2006).

Os primeiros autores a relatar a presença de piroplasmas em eritrócitos de gatos domésticos foram Lingard e Jennings em 1904, os quais, de acordo com Boswan et al. (2006), não ilustraram ou sequer descreveram seus achados.

Em 1929, Davis observou inclusões em eritrócitos de um gato selvagem africano da espécie *Felis sylvestris* Schreber, 1777 (sinonímea: *Felis ocreata*) do Sudão. Este autor nomeou este parasito como *B. felis*. Ao ser inoculado experimentalmente em gatos domésticos, verificou-se que o pequeno piroplasma, embora transmissível, não foi capaz de causar doença clínica (SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2004). O organismo foi descrito pela primeira vez como agente causador de doença em gatos domésticos por Jackson e Dunning em 1937,



na África do Sul. Os gatos infectados apresentavam febre alta e sintomas semelhantes aos da febre biliar de bovinos e eqüinos. Diante destes achados, o parasito foi batizado como *Nuttallia felis* variedade *domestica*. A designação variedade foi utilizada para diferenciá-la, com base em sua patogenicidade, da espécie *B. felis* previamente descrita por Davis. Ambas espécies eram morfologicamente indistinguíveis (SCHOEMAN et al., 2001).

Outras espécies do gênero *Babesia* foram descritas infectando felídeos: *Babesiella felis*, em um puma (*Felis concolor*), por Carpano em 1934; *Babesia cati*, em um gato selvagem da Índia (*Felis catus*), por Mudaliar et al, em 1950; *Babesia herpailuri* em um jaguarundi (*Herpailurus yaguarondi* Lacépède, 1809), por Dennig em 1967 e *Babesia pantherae* em um leopardo (*Panthera pardus* Linnaeus, 1758), por Dennig e Brocklesby em 1972 (BOSMAN et al., 2007).

Pequenos babesídeos não classificados foram relatados em lincos (*Felis rufus*) na América do Norte, por Wenyon e Hamerton em 1930; no leopardo-da-Índia (*Panthera pardus fusca* Meyer, 1794), por Shortt em 1940; em leões (*Panthera leo*), por Barnett e Brocklesby em 1968 e em cheetas (*Acinonyx jubatus*), por Averbek et al. em 1990 (BOSMAN et al., 2007)

Uma nova denominação de espécie, *Babesia leo*, foi criada para dar nome aos pequenos piroplasmas observados em eritrócitos de leões em um parque na África do Sul. O parasito *B. leo* é morfologicamente similar à espécie *B. felis* encontrada em gatos domésticos, porém estas diferem filogeneticamente e sorologicamente (LÓPEZ-REBOLLAR et al., 1999; PENZHORN et al., 2001). Experimentalmente, gatos domésticos e leopardos são susceptíveis à infecção por *B. leo* (LÓPEZ-REBOLLAR et al., 1999).

Na década de 1970, alguns autores sugeriram que todos os pequenos piroplasmas de felídeos pertenciam à espécie *B. felis* (Dennig e Brocklesby, 1972 apud BOSMAN et al., 2007). Recentemente, questão semelhante foi levantada por Schoeman et al. (2001), ao se indagarem se os organismos classificados como *B. felis* relatados em gatos domésticos e felídeos selvagens se tratavam, na realidade, de uma única espécie.

O uso de ferramentas de diagnóstico molecular possui como vantagens sua sensibilidade e especificidade, particularmente nos estágios iniciais da infecção ou em infecções crônicas, quando a parasitemia é menor. As técnicas de PCR quantitativas podem ser utilizadas para monitorar o tratamento e a eliminação dos

parasitos (SHAW et al., 2001). O seqüenciamento genético tem auxiliado o estudo da diversidade genética entre os piroplasmas, contribuindo para a descoberta de novos e inesperados hospedeiros para os mesmos (CRIADO-FORNELIO et al., 2004).

### 2.2.2. Epidemiologia

Muitas espécies do gênero *Babesia* foram descritas infectando felídeos selvagens e gatos domésticos. *B. herpailuri* e *B. pantherae* são grandes piroplasmas intraeritrocíticos de felídeos selvagens na África, transmitidos experimentalmente com sucesso para gatos domésticos (TABOADA e LOBETTI, 2006). Nos EUA, há apenas um relato de caso de babesiose felina acometendo uma pantera da Flórida (*Puma concolor coryi*). A infectividade e a patogenicidade do gênero *Babesia* para gatos domésticos não é conhecida (YABSLEY et al., 2006).

As espécies do gênero *Babesia* que já foram diagnosticadas em gatos naturalmente infectados são *B. felis* e *B. leo* na África, *B. cati* na Índia, *B. canis canis* na Espanha e em Portugal, *B. microti-simile* em Portugal, *B. canis presentii* em Israel (SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2004; YABSLEY et al., 2006) e *B. canis vogeli* no Brasil (CARNEIRO, 2007).

Felinos domésticos são mais comumente acometidos por parasitos da espécie *B. felis*, a qual é descrita como altamente patogênica para estes animais. Este piroplasma é rotineiramente diagnosticado em gatos da região da costa sul da África do Sul e no Sudão (TABOADA e LOBETTI, 2006; YABSLEY et al., 2006). Geralmente, os gatos infectados são adultos jovens, de menos de três anos de idade; sexo e raça não são tidos como fatores de risco para infecção (JACOBSON et al., 2000; SCHOEMAN et al., 2001).

Em estudo epidemiológico realizado na Espanha e em Portugal, o DNA de *B. canis canis* foi amplificado em amostras de sangue de três gatos, nas quais os parasitos não foram visualizados por microscopia óptica (CRIADO-FORNELIO et al., 2003). Classicamente, esta é uma espécie cujo hospedeiro mamífero é o cão, sendo esta a primeira descrição em literatura do agente em gatos domésticos.

Utilizando-se de técnicas moleculares, o DNA de *B. canis* foi encontrado no sangue de dois gatos domésticos em Israel, os quais apresentavam clínica

compatível com babesiose. Baseando-se na análise filogenética, os autores sugeriram a criação de uma nova subespécie: *B. canis presentii* (BANETH et al., 2004).

#### 2.2.2.1. Distribuição geográfica

A babesiose em gatos domésticos possui distribuição mundial, tendo sido relatada em vários países, como França, Alemanha, Tailândia, Índia, Zimbábue (PENZHORN et al., 2004), Espanha, Portugal (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) e Israel (BANETH et al., 2004). No entanto, a doença clínica é mais frequentemente observada em animais residentes na África do Sul, onde a babesiose felina é diagnosticada em gatos de regiões próximas à costa (PENZHORN et al., 2004). Até o presente momento, parasitos do gênero *Babesia* não foram relatados infectando gatos domésticos nos EUA (TABOADA e LOBETTI, 2006).

No Brasil, há poucos relatos de babesiose felina, sendo que a espécie identificada em gatos ainda não foi caracterizada (O'DWYER e MASSARD, 2002). Piropasmas foram identificados em esfregaços sangüíneos de gatos domésticos no Rio de Janeiro (ALMOSNY e BOMPET, 1999; SOUZA, 2002; GAZETA et al., 2004) e no interior de São Paulo (PICHOTANO et al., 2004), sem que se realizasse a caracterização molecular deste microorganismo.

A babesiose felina foi diagnosticada pela técnica de PCR por Carneiro (2007) em um gato doméstico fêmea, SRD, com mais de 10 anos de idade, proveniente de Piracicaba-SP. O animal havia sido encaminhado ao atendimento médico veterinário devido a suspeita de insuficiência renal crônica. O seqüenciamento genético desta amostra demonstrou 100% de similaridade com a *B. canis vogeli* caracterizada em cães do estado de Minas Gerais e São Paulo por Passos et al. (2005).

#### 2.2.2.2. Transmissão

O modo de transmissão natural de *Babesia* spp para felídeos ainda não é conhecido (PENZHORN et al., 1999, JACOBSON et al., 2000; SHAW et al., 2001), mas acredita-se que o protozoário seja transmitido por carrapatos ixodídeos durante

o repasto sanguíneo (SHAW et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006). Em um estudo filogenético, Penzhorn et al. (2001) agruparam a espécie *B. felis* juntamente com a *B. microti*, na qual ocorre transmissão transestadial por carrapatos.

A transmissão iatrogênica de *Babesia* spp pode ocorrer através da inoculação de sangue de animais infectados (LÓPEZ-REBOLLAR et al., 1999; SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2004; REINE, 2004; TABOADA e LOBETTI, 2006), ou por meio da utilização de agulhas e instrumentos cirúrgicos contaminados com sangue contendo os parasitos (TABOADA e LOBETTI, 2006).

Já foi demonstrado que a transmissão de *B. gibsoni* em cães pode ocorrer através de feridas por mordedura e seu contato com sangue ou saliva. Após briga com animais infectados, cães previamente sadios demonstraram o desenvolvimento de sinais clínicos da doença dentro de duas semanas (TABOADA e LOBETTI, 2006).

### 2.2.3. Ciclo biológico

O ciclo biológico de *Babesia* spp. envolvidas na babesiose felina ainda não foi elucidado. Contudo, é provável que carrapatos ixodídeos desempenhem o papel de vetor biológico do parasito (TABOADA e LOBETTI, 2006).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os esporozoítas presentes na saliva do carrapato se ligam à membrana do eritrócito, sendo englobados, provavelmente, por endocitose. No interior desta célula, a membrana plasmática que envolve o parasito sofre desintegração; todos os estágios parasitários subseqüentes ocorrem em contato direto com o citoplasma da célula-hospedeira. Os microorganismos se diferenciam em merozoítas, os quais originam trofozoítas pleomórficos. O parasito multiplica-se no eritrócito através de sucessivas fissões binárias, que eventualmente levam à lise celular. A reprodução assexuada por merogonia dá origem a um maior número merozoítas, que infectam outros eritrócitos. No entanto, nas espécies de *Babesia* que acometem felídeos, são comumente observados de um a dois, e não mais que quatro merozoítas no interior de hemácias (URQUHART et al., 1998; TABOADA e LOBETTI, 2006).

O carrapato se infecta ao ingerir os eritrócitos contendo merozoítas, durante o repasto sanguíneo. Estes se diferenciam no lúmen intestinal do trato digestivo do

hospedeiro invertebrado em macro e microgametas, os quais se fusionam para originar o zigoto. O zigoto penetra na parede intestinal, e através da hemolinfa migra até as glândulas salivares do artrópode. Nesta, ocorre replicação dos esporozoítas, com engurgitamento das células da glândula salivar e, eventualmente, brotamento de esporozoítas na superfície epitelial, os quais são liberados na saliva do carrapato (TABOADA e LOBETTI, 2006).

No hospedeiro invertebrado pode ocorrer, ainda, a transmissão transovariana, na qual o zigoto migra para os ovários da fêmea, diferenciando-se em merozoítas no interior de oócitos. Ocorrendo a ovopostura, estes ovos, já infectados, se desenvolvem em larvas, ninfas e adultos parasitados. Nestes, são observados esporozoítas capazes de infectar o hospedeiro vertebrado (URQUHART et al., 1998; TABOADA e LOBETTI, 2006).

#### 2.2.4. Aspectos clínicos da doença

A babesiose felina é uma doença de baixa prevalência, apresentando-se, geralmente, com curso sub-agudo a crônico (SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2004). Os sinais clínicos mais comuns da babesiose felina sintomática são anorexia, letargia, fraqueza, pelagem áspera e diarreia (FUTTER e BELONJE, 1980; JACOBSON et al., 2000). Diferentemente da babesiose em cães, a febre e a icterícia não são achados comuns em gatos. Na maioria dos casos em que a febre está presente, é diagnosticada uma doença concomitante (FUTTER e BELONJE, 1980).

Os gatos geralmente se adaptam à anemia, podendo apresentar apenas sinais clínicos discretos. Contudo, em situações estressantes, como, por exemplo, um exame físico, pode-se observar dispnéia. Infecções concomitantes com hemoplasmas, FeLV ou FIV podem contribuir para a apresentação clínica e gravidade da doença (TABOADA e LOBETTI, 2006).

As possíveis complicações da babesiose felina são insuficiência renal, edema pulmonar, hepatopatia, acometimento do sistema nervoso central e doenças concomitantes (JACOBSON et al., 2000; TABOADA e LOBETTI, 2006). A maior parte dos sinais clínicos é secundária à anemia hemolítica (TABOADA e LOBETTI, 2006). Em gatos infectados experimentalmente, a anemia é mais acentuada após

três semanas de inoculação, havendo significativa diminuição dos parâmetros de hematócrito, hemoglobina e hematimetria (FUTTER et al., 1980).

Devido ao limitado número de estudos sobre a babesiose felina, não se pode descartar a possibilidade do felino ser capaz de manter uma parasitemia persistente, mesmo após o tratamento e a melhora clínica dos sintomas da doença, da mesma forma que em cães (SHAW et al., 2001).

#### 2.2.5. Alterações hematológicas e na bioquímica sérica

Em gatos com babesiose clínica, o achado hematológico mais consistente é uma anemia macrocítica, hipocrômica e regenerativa. Os piroplasmas intraeritrocíticos podem ou não estar presentes (SCHOEMAN et al., 2001; BOWMAN et al., 2002; TABOADA e LOBETTI, 2006). A anemia é resultante da hemólise intra e extravascular (SCHOEMAN et al., 2001). Em infecções experimentais, a anemia foi mais acentuada aproximadamente três semanas após a infecção (FUTTER et al., 1980).

Esfregaços sanguíneos revelam alterações indicativas de um quadro de anemia regenerativa, tais como aumento da presença de corpúsculos de Howell-Jolly, eritrócitos nucleados, policromasia e anisocitose. A eritrofagocitose por monócitos também pode ser observada (FUTTER et al., 1980). A anemia hemolítica imunomediada secundária pode estar ocasionalmente presente, quando o teste de aglutinação em salina traduz-se em resultado positivo (SCHOEMAN et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006). Não ocorrem alterações características no leucograma de gatos com babesiose. A trombocitopenia é comum em outras espécies acometidas pela doença, sendo, todavia, um achado inconsistente em gatos (BOWMAN et al., 2002; SCHOEMAN et al., 2001; FUTTER et al., 1980).

A atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) está significativamente aumentada na maioria dos casos, enquanto as atividades de fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT) encontram-se, geralmente, dentro dos intervalos de referência (SCHOEMAN et al., 2001; BOWMAN et al., 2002; PENZHORN et al., 2004; TABOADA e LOBETTI, 2006). O aumento da concentração total de bilirrubinas séricas se trata de um achado comum (SCHOEMAN et al., 2001; BOWMAN et al., 2002; TABOADA e LOBETTI, 2006) devido à hemólise, embora

uma lesão hepatocelular possa contribuir sinergicamente para este aumento (PENZHORN et al., 2004). A gamopatia policlonal foi observada em gatos que apresentavam hipergamaglobulinemia (SCHOEMAN et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006). A babesiose felina geralmente não causa alterações na função renal e hepática; as concentrações de uréia, creatinina, proteína plasmática total e colesterol tendem a estar dentro dos valores de referência, bem como a gasometria (FUTTER et al., 1981).

#### 2.2.6. Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose felina pode ser realizado com a identificação de piroplasmas no interior de eritrócitos em esfregaços de sangue periférico ou aspirado de medula óssea, linfonodos e baço (SHAW et al., 2001). Em esfregaços corados pelo método de Giemsa ou por outros corantes do tipo Romanowsky, os merozoítas de *Babesia* sp. adquirem tons de azul claro, apresentando densos grânulos de cromatina. Muitos organismos exibem um grande vacúolo central, que lhes dá uma aparência anelar. Podem ser observados organismos únicos, em pares ou em tétrades. *Babesia cati* e *B. herpailuri* são identificados em formas de cruz, típicas da divisão quaternária no interior de eritrócitos (Denning e Hebel, 1969 apud BOWMAN et al., 2002). *Babesia felis* e *B. cati* são classificadas como pequenas babesias, medindo, respectivamente, 0,9 x 0,7µm e 1,0 x 1,5µm. Por outro lado, *B. herpailuri* e *B. canis ssp presentii* são consideradas como grandes babesias, medindo 1,0 x 2,5µm e 1,7 x 2,7µm, respectivamente (TABOADA e LOBETTI, 2006).

A visualização dos organismos em esfregaços sanguíneos pode ser uma tarefa difícil, pois o número de eritrócitos parasitados é geralmente pequeno, razão pela qual este método possui baixa sensibilidade (SHAW et al., 2001). Além disto, não é possível realizar, através de microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, a diferenciação entre os pequenos parasitos do gênero *Babesia* e *C. felis* (KIER et al., 1987; HOOVER et al., 1994; MEINKOTH e KOCAN, 2005; UILENBERG, 2006; YABSLEY et al., 2006). Não obstante, devido à baixa especificidade do método diagnóstico, resultados falso-positivos podem ocorrer em presença de precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly ou de outros hemoparasitas, como, por exemplo, *Mycoplasma haemofelis* (SCHOEMAN et al., 2001).

A histopatologia de órgãos, como baço, fígado e pulmões, permite o diagnóstico diferencial entre *Babesia* sp. e *Cytauxzoon* sp., uma vez que apenas organismos do gênero *Cytauxzoon* multiplicam-se em células do sistema fagocítico-monocitário (NEITZ e THOMAS, 1948; SIMPSON et al., 1985a; KIER et al., 1987).

Testes sorológicos para o diagnóstico da babesiose canina foram desenvolvidos. Contudo, esta técnica ainda não pôde ser utilizada com segurança no diagnóstico da babesiose felina, já que os valores de referência para títulos sorológicos relacionados à babesiose ainda não foram estabelecidos em gatos (SHAW et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006).

O diagnóstico de piroplasmas intraeritrocíticos em felinos pode ser realizado com o uso de técnicas moleculares (CRIADO-FORNELIO et al., 2004; MEINKOTH e KOCAN, 2005; TABOADA e LOBETTI, 2006). A detecção do DNA de piroplasmas em sangue de gatos permite a identificação da espécie envolvida, seja pelo uso de iniciadores específicos ou através do seqüenciamento do DNA amplificado (BANETH et al., 2004; CRIADO-FORNELIO et al., 2004; YABSLEY et al., 2006).

#### 2.2.7. Tratamento

Resultados questionáveis foram obtidos perante a avaliação da maioria das drogas utilizadas para tratamento de infecções experimentais de *Babesia* spp em gatos domésticos (POTGIETER, 1981; PENZHORN et al., 2000). O fosfato de primaquina, administrado oralmente ou por via intramuscular na dose de 0,5mg/kg, possui comprovada atividade babesicida. No entanto, a sua utilização pela via oral está associada à emese, tendo sido letal em doses superiores a 1,0mg/kg (POTGIETER, 1981). A primaquina foi capaz de reduzir a parasitemia, não sendo eficaz na eliminação da infecção por *B. felis* (PENZHORN et al., 2000). Não foram detectados efeitos significativos anti-babesia com o uso de buparvaquona, enrofloxacina e danofloxacina (PENZHORN et al., 2000). Foram identificados efeitos parasiticidas com o uso de rifampicina e de combinação contendo sulfadiazina-trimethoprim, os quais se mostraram inferiores aos da primaquina (PENZHORN et al., 2000). Para o tratamento efetivo da babesiose, podem ser necessárias repetidas aplicações de medicação anti-babesia, e em alguns casos, terapias prolongadas por



longos períodos (PENZHORN et al., 2004). Raramente são necessárias transfusões sanguíneas em gatos com babesiose (SHAW et al., 2001).

#### 2.2.8. Prognóstico

Em um estudo envolvendo 20 gatos com babesiose experimental e 70 animais com a doença natural, todos os animais que não receberam tratamento vieram ao óbito (FUTTER e BELONJE, 1980). A resposta ao tratamento apropriado geralmente é favorável, embora possa ocorrer a recorrência da doença clínica e/ou infecção crônica (FUTTER et al., 1981). Co-infecções com FeLV, FIV ou hemoplasmas foram diagnosticadas em conjunto com *Babesia* spp., prejudicando a resposta à terapia instituída (SCHOEMAN et al., 2001; SHAW et al., 2001).

#### 2.2.9. Prevenção

Para a prevenção da babesiose felina, são recomendadas as mesmas medidas tomadas para a citauxzoonose. Deve-se estabelecer um controle de carrapatos adequado (SHAW et al., 2001, TABOADA e LOBETTI, 2006), e evitar que o gato tenha acesso a ambientes externos, nos quais estaria vulnerável à infestação por carrapatos (GREENE et al., 2006). A identificação de possíveis reservatórios infectados através de técnicas de biologia molecular se trata de uma importante alternativa; animais doadores de sangue devem ter resultado negativo na PCR para *Babesia* spp (REINE, 2004).

## 2.3. Micoplasmas hemotrópicos

### 2.3.1. Histórico e etiologia

Em 1942, Clark descreveu pela primeira vez a infecção por um hemoplasma em um gato da África do Sul. O autor analisou esfregaços de sangue e baço de um gato doméstico que veio ao óbito devido à intensa anemia, observando a presença de parasitas de formato anelar, cujo tamanho variava entre 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estes se encontravam na superfície dos eritrócitos circulantes e também no interior de células do baço. Devido à localização epieritrocitária, o agente foi classificado como pertencente ao gênero *Eperythrozoon*, o qual nunca havia sido descrito em gatos. A nova espécie foi nomeada como *E. felis*.

Flint e Moss (1953) descreveram a infecção natural pelo agente causador da Anemia Infecciosa Felina (AIF) em um gato do Estado do Colorado, EUA. Este animal apresentava-se bastante debilitado e anorético, com sintomas de anemia acentuada. De acordo com estes autores, pequenos corpúsculos arredondados aderidos sobre a superfície dos eritrócitos podiam ser visualizados em esfregaços sangüíneos, com aparência similar à do organismo *Anaplasma marginale*. Em seu trabalho, Flint e Moss (1953) encontraram dificuldade ao classificar o parasito, pois este era morfológicamente semelhante tanto a parasitos do gênero *Haemobartonella* quanto a *Eperythrozoon*. Os autores foram capazes de reproduzir experimentalmente a doença através da inoculação via intraperitoneal de sangue do animal naturalmente infectado em gatos saudáveis.

Flint e McKelvie (1955) propuseram o nome de *Haemobartonella felis* ao agente causador da AIF: uma condição infecciosa aguda, sub-aguda ou crônica que acomete gatos. A apresentação aguda caracteriza-se por febre, anemia hemolítica acentuada, anorexia, depressão e rápida perda de peso. De acordo com estes autores, a AIF não se tratava de uma nova doença, mas de uma condição pouco diagnosticada em gatos, presente em diversos Estados dos EUA. Holzworth (1956) relatou que aproximadamente 25% dos gatos investigados por conta de anemias hemolíticas nos EUA apresentavam-se infectados com organismos causadores da AIF.

Seamer e Douglas (1959) verificaram que este mesmo agente causal da anemia infecciosa felina estava presente na Inglaterra. Neste estudo, descreveram a ocorrência natural da doença na Cidade de Cambridge, a morfologia do parasito e o desenvolvimento de infecções experimentais, concluindo tratar-se do mesmo agente presente nos EUA. De forma contrastante, Thomsett (1960) não encontrou o parasito em gatos provenientes da área metropolitana de Londres, afirmando que a baixa ocorrência da doença impediu a realização de um diagnóstico durante o período de seu trabalho. Pelo fato do agente causador da doença anteriormente descrita em Cambridge por Seamer e Douglas em (1959) ser morfologicamente similar àqueles descritos em outros países, particularmente nos EUA, foi levantada a hipótese de que o agente teria sido introduzido na Inglaterra através de um gato infectado vindo de outro país.

Na Austrália, o primeiro caso de AIF foi descrito no início da década de 60, quando um estudo investigativo sobre a doença foi conduzido por Manus (1962), o qual relatou em detalhes três casos clínicos. Em um deles, o gato apresentou os sintomas clássicos da doença, com quadro bastante semelhante àqueles descritos pelos autores americanos.

Taxonomicamente, os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram inicialmente agrupados no Reino Procariotae, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales e na Família Anaplasmataceae. Esta classificação taxonômica é decorrente de suas características morfológicas, como a ausência da membrana externa e do flagelo, e biológicas, pelo fato destes parasitos de eritrócitos não serem cultiváveis, assemelhando-se com *Anaplasma* sp. (KREIER e RISTIC, 1984; RISTIC e KREIER, 1984). Os parasitos dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* se aderem e crescem primariamente na superfície de eritrócitos. No entanto, há um contraste quanto à presença destes parasitos livres no plasma: os classificados como *Eperythrozoon* sp. ocorrem em freqüências semelhantes em eritrócitos e livres no plasma, enquanto que apenas pequenas quantidades de *Haemobartonella* sp. circulam livremente (VENABLE e EWING, 1968; DEMAREE e NESSMITH, 1972).

Com advento da análise filogenética, houve gradativa reclassificação destes parasitos. Ao analisarem a seqüência de genes da subunidade 16S do RNA ribossomal de *H. felis*, Rikihisa et al. (1997) concluíram que tanto o gênero *Haemobartonella* quanto o parasito *Eperythrozoon suis* não pertenciam à Família

Anaplasmataceae ou à Ordem Rickettsiales, estando geneticamente mais próximos às espécies do gênero *Mycoplasma*. Estes autores sugeriram que *E. suis* fosse reclassificado em um único gênero, juntamente com *H. felis* Ohio-Florida, *H. felis* Califórnia e *H. muris*. Embora *H. felis* Ohio-Florida e *H. felis* Califórnia causem anemia em gatos, ambos apresentaram grande divergência (maior que 15%) na seqüência genética analisada, tratando-se, na verdade, de duas espécies distintas (RIKIHISA et al., 1997).

Neimark et al. (2001) propuseram que as espécies descritas de *Haemobartonella* fossem removidas da Ordem Rickettsiales e da Família Anaplasmataceae, e transferidas para o gênero *Mycoplasma*, adotando os nomes de 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*' e 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*'. Sugeriram, ainda, que as espécies descritas de *Eperythrozoon* fossem removidas da Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, e reagrupadas no gênero *Mycoplasma* como 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' e 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. Estes novos micoplasmas hemotrópicos foram chamados genericamente de hemoplasmas (NEIMARK et al., 2001).

A revisão dos nomes publicados dos micoplasmas hemotrópicos foi proposta por Neimark et al. em 2002. A designação 'Candidatus' pode ser utilizada somente para táxons novos e não completamente descritos, a fim de dar aos mesmos um *status* provisório. Diante disto, foram aceitos os nomes *Mycoplasma haemofelis* (basônimo *Haemobartonella felis*), *Mycoplasma haemomuris* (basônimo *Haemobartonella muris*) e *Mycoplasma wenyonii* (basônimo *Eperythrozoon wenyonii*). O nome 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' foi alterado para *Mycoplasma suis*, devido a violações de regras taxonômicas estabelecidas pelo Bacteriological Code e pela inexistência de espécie *Mycoplasma suis* descrita previamente (NEIMARK et al., 2002).

Após sua reclassificação no táxon, a variante previamente conhecida como "large" (do inglês, grande) *H. felis* (a qual possui como sinônimos as cepas Ohio, Florida, Oklahoma e Illinois), passou a ser chamada de *M. haemofelis*, enquanto que a variante "small" (do inglês, pequeno) *H. felis* (cujos sinônimos são as cepas Califórnia e Birmingham) recebeu o nome 'Candidatus *M. haemominutum*' (FOLEY e PEDERSEN, 2001; NEIMARK et al., 2001).

Messick et al. (2002) propuseram, baseando-se na análise filogenética do gene 16S do rRNA, as seguintes novas espécies: 'Candidatus *M. haemodidelphidis*',

parasita de eritrócitos de gambás (*Didelphis virginiana*); ‘*Candidatus M. haemolamae*’, parasita de hemácias de alpacas (*Lama pacos*); e *M. haemocanis* (basônimo *Haemobartonella canis*), parasita de eritrócitos de cães (*Canis familiaris*).

Uma terceira espécie de hemoplasma felino, denominada ‘*Candidatus M. turicensis*’, foi descrita por WILLI et al. (2005) em um gato na Suíça, apresentando hemólise intravascular acentuada. Este mesmo agente foi diagnosticado em gatos domésticos do Reino Unido, Austrália, África do Sul (WILLI et al., 2006a), Japão (FUJIHARA et al., 2007) e EUA (SYKES et al., 2007a). Não obstante, uma nova espécie de hemoplasma canino, denominada ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, também parece possuir a capacidade de infectar gatos domésticos (SYKES et al., 2007b). As classificações taxonômicas anteriores e a atualmente utilizada para hemoplasmas felinos estão agrupadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação taxonômica dos hemoplasmas felinos, vigente até o início da presente década (esquerda) e a nova classificação, instituída após a reclassificação do parasito no táxon.

	<b>Classificação anterior</b> (RISTIC e KREIER, 1984)	<b>Classificação atual</b> (NEIMARK et al., 2001)
Reino	Procariotae	Bacteria
Filo	Proteobacteria	Firmicutes
Classe	Alphaproteobacteria	Mollicutes
Ordem	Rickettsiales	Mycoplasmatales
Família	Anaplasmataceae	Mycoplasmataceae
Gênero	<i>Haemobartonella</i>	<i>Mycoplasma</i>
Espécies	<i>H. felis</i> “large form” cepas Ohio, Florida, Oklahoma e Illinois	<i>M. haemofelis</i> (Neimark et al., 2001)
	<i>H. felis</i> “small form” cepas Califórnia e Birmingham	‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i> ’ (Foley e Pedersen, 2001)
	NA	‘ <i>Candidatus M. turicensis</i> ’ (Willi et al., 2005)
	NA	‘ <i>Candidatus M. haematoparvum</i> ’ (Sykes et al. 2005, 2007a)

NA: Não aplicável. Tabela adaptada de Macieira (2008).

### 2.3.2. Epidemiologia

Em um estudo conduzido recentemente na Europa, os fatores de risco associados à epidemiologia da infecção por hemoplasmas em gatos incluíram idade mais avançada, sexo masculino, possuir acesso ao ambiente externo, habitar locais com temperaturas médias mais elevadas e com a presença de artrópodes, prováveis vetores do parasito (WILLI et al., 2006b).

#### 2.3.2.1. Distribuição geográfica

Na última década, baseando-se em técnicas moleculares, infecções por micoplasmas hemotrópicos felinos foram diagnosticadas em gatos domésticos em todo o mundo (JENSEN et al., 2001; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; TASKER et al., 2003; WATANABE et al., 2003; INOKUMA et al., 2004; LOBETTI e TASKER, 2004; TASKER et al., 2004; WILLI et al., 2006a, 2006b; YU et al., 2007; MACIEIRA, 2008).

No Brasil, através da avaliação de esfregaços sangüíneos de dois gatos esplenectomizados de aproximadamente três meses de idade, nascidos e criados no Estado do Rio de Janeiro, Massard et al. (1978) evidenciaram parasitismo por *H. felis*. Um destes animais apresentava-se profundamente anêmico. Ambos os gatos encontravam-se parasitados por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*.

Souza (2002) identificou, ao analisar esfregaços de sangue periférico por microscopia óptica, hemoplasmas em gatos das regiões de Jurujuba (Niterói-RJ), Largo da Batalha (Niterói-RJ) e São Cristóvão (Rio de Janeiro-RJ), com freqüências, respectivamente, de 53,6%, 46,4% e 41,3%.

Através da técnica de análise do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição associada à PCR (RFLP-PCR), Batista (2004) avaliou a freqüência de infecções por *M. haemofelis* e por '*Candidatus M. haemominutum*' em gatos da região de Botucatu-SP. Foi encontrada uma freqüência de infecção por hemoplasmas de 14,9%. Dentre os positivos, 7,1% eram infecções por *M. haemofelis*, 2,6% por '*Candidatus M. haemominutum*', com 5,2% de co-infecção.

Baumann et al. (2006) analisaram, através de técnicas moleculares, uma população de gatos anêmicos oriundos de Curitiba-PR, e detectaram infecções por

hemoplasmas em 56,7% dos animais testados, observando ocorrência de 37,8% de *M. haemofelis* e 10,8% de '*Candidatus M. haemominutum*'.

A co-infecção com *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' na América do Sul foi reportada em três gatos adultos, duas fêmeas e um macho, os quais apresentavam o quadro clínico clássico da doença produzida por hemoplasmas: anemia, letargia, anorexia e febre (MORAIS et al., 2007).

Guimarães et al. (2007) relataram a detecção molecular de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' em sangue coletado de um leão (*Panthera leo*) mantido em cativeiro no zoológico de Curitiba-PR. A visualização de uma banda fraca como resultado da PCR associada à ausência de sinais clínicos, leucograma sem alterações e ausência do parasito em esfregaços sanguíneos indicou tratar-se de uma infecção crônica. Os autores propuseram ainda que esta doença pudesse adotar novamente a fase aguda quando da imunossupressão do animal, seja pelo estresse do manejo ou pelo tratamento com corticóides.

Em um estudo sobre a ocorrência de hemoplasmas em espécies de felídeos selvagens, o DNA de hemoplasmas foi detectado em 10% das amostras de animais provenientes do zoológico de São Paulo-SP (WILLI et al., 2007a). A co-infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' foi diagnosticada em um gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schniz, 1821), enquanto que o DNA de '*Candidatus M. turicensis*' foi detectado em uma co-infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) (WILLI et al., 2007a). Este foi o primeiro relato envolvendo a presença da espécie '*Candidatus M. turicensis*' no Brasil.

Ao investigar a prevalência e os fatores de risco para infecção por hemoplasmas em gatos naturalmente infectados com FIV e/ou FeLV na Cidade do Rio de Janeiro, Macieira (2008) diagnosticou 16% dos animais positivos para hemoplasmas. Este autor verificou que animais FIV ou FIV e FeLV positivos possuíam maiores chances de estarem infectados por hemoplasmas, principalmente pela espécie '*Candidatus M. haemominutum*'. Dentre os animais de raça pura, o *status* FIV positivo teve uma associação à infecção por hemoplasmas. Os fatores de risco idade, sexo e presença de pulgas não foram implicados na infecção por hemoplasmas.

Os dados presentes na literatura quanto à distribuição geográfica e a prevalência das infecções por hemoplasmas felinos no mundo encontram-se compilados na Tabela 2.



**Tabela 2:** Distribuição geográfica e prevalência das infecções por hemoplasmas no sangue de gatos domésticos (compilação de literatura).

Local do estudo	Gatos (n)	Hemopl. %	Mhf %	CMhm %	Mhf + CMhm %	CMt %	CMt + CMhm %	CMt + Mhf %	Mhf + CMhm + CMt %	Metodologia utilizada	Referência
Inglaterra	97	8,25	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Microscopia	Seamer e Douglas, 1959
EUA	43514	0,86	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Microscopia e necrópsia	Hayes e Priester, 1973
Escócia	155	23	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Microscopia	Nash e Bobade, 1986
EUA	123	4,9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Microscopia	Grindem et al., 1990
EUA*	220	19,5	4,5	12,7	2,3	NI	NI	NI	NI	PCR	Jensen et al., 2001
Brasil (RJ)	101	47	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Microscopia	Souza, 2002
Espanha*	30	30	20	10	NI	NI	NI	NI	NI	RFLP-PCR	Criado-Fornelio et al., 2003
Reino Unido*	426	18,5	1,4	16,9	0,2	NI	NI	NI	NI	PCR	Tasker et al., 2003
Brasil (SP)	154	14,9	7,1	2,6	5,2	NI	NI	NI	NI	RFLP-PCR	Batista, 2004
Japão*	102	17,7	2	15,7	0	NI	NI	NI	NI	RFLP-PCR	Inokuma et al., 2004
Canadá*	60	38,3	26,66	11,66	0	NI	NI	NI	NI	PCR	Kewish et al., 2004
EUA (Flórida)‡	484	20,45	8,3	12,2	3,9	NI	NI	NI	NI	PCR	Luria et al., 2004
Austrália	147	27,9	4,1	23,1	0,7	NI	NI	NI	NI	RT-PCR	Tasker et al., 2004
Brasil (PR)*	37	56,7	37,8	10,8	7,9	NI	NI	NI	NI	PCR	Baumann et al., 2006
EUA (Arizona)‡	112	10,75	1,8	6,25	2,7	NI	NI	NI	NI	PCR	Eberhardt et al., 2006
EUA**	92	34,8	7,6	21,7	5,4	NI	NI	NI	NI	PCR	Lappin et al., 2006
EUA▣	118	11,86	3,4	7,6	0,85	NI	NI	NI	NI	RT-PCR	Hackett et al., 2006
Austrália	147	32,65	4,1	17,7	0,7	4,1	5,4	0,7	0	PCR, RT-PCR	Willi et al., 2006a
África do Sul	69	52,17	1,4	14,5	7,2	10,1	13	2,9	2,9	PCR, RT-PCR	Willi et al., 2006a
Reino Unido	426	19,2	1,2	15,5	0,2	0,7	1,4	0,2	0	PCR, RT-PCR	Willi et al., 2006a
Suíça*	713	11,64	10	1,5	0,3	1,3	0,8	0	0	RT-PCR	Willi et al., 2006b
Japão	60	58,3	10	35	3,4	0	1,7	1,7	6,7	PCR	Fujihara et al., 2007
EUA (Colorado)*	176	17,6	4,5	8	2,3	NI	NI	NI	NI	PCR	Ishak et al., 2007
EUA (Califórnia)*	263	18	1,1	16,7	0	NI	NI	NI	NI	PCR e RT-PCR ( <i>TaqMan</i> )	Sykes et al., 2007a
Brasil (RJ)	149	16	4	10	2	NI	NI	NI	NI	PCR e SB	Macieira, 2008
Reino Unido*	1585	14	1,9	9,7	0,7	0,8	0,6	0,1	0,1	RT-PCR	Peters et al., 2008
Alemanha	262	27,9	4,6	22,5	0,8	NI	NI	NI	NI	PCR	Bauer et al., 2008

Legenda da tabela 2:

**Hemopl.:** hemoplasmas; **Mhf:** *Mycoplasma haemofelis*; **CMhm:** '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'; **CMt:** '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'; **NI:** não investigado. **PCR:** Reação em cadeia da polimerase; **RFLP-PCR:** análise do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição associada à PCR; **RT-PCR:** Real time PCR, ou PCR em tempo real. \*Estudos envolvendo animais suspeitos de infecção por hemoplasmas. \*\*Estudo realizado somente com gatos infestados por pulgas. †Estudo realizado com gatos domésticos de vida-livre ou de abrigos. ▣Estudo realizado com 146 gatos doadores de sangue, dos quais 28 eram animais de laboratório, PCR-negativos para hemoplasmas.

### 2.3.2.2. Transmissão

A transmissão experimental de hemoplasmas pode ocorrer através da inoculação parenteral e intraperitoneal, bem como por meio da ingestão de sangue contaminado (FLINT e MOSS, 1953; FLINT et al., 1958; HARVEY e GASKIN, 1977).

Quanto à infecção natural, acredita-se que a disseminação por meio de artrópodes hematófagos seria o modo primário de transmissão do parasito (HARVEY, 2006), embora esta não tenha sido estabelecida experimentalmente com sucesso em gatos. Pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* já foram infectadas experimentalmente a partir de gatos positivos para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (WOODS et al., 2005). Contudo, a transmissão da doença para gatos por meio de pulgas infectadas com os parasitos não foi totalmente comprovada (LAPPIN et al., 2006).

Através da técnica de PCR, a presença do DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi detectada em 40% das pulgas da espécie *Ct. felis* retiradas de cães e gatos do Reino Unido, ou em 49% das pulgas, se consideradas apenas aquelas coletadas de gatos (SHAW et al., 2004). O DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* foi detectado em *Ct. felis*, bem como em suas fezes e ovos (WOODS et al., 2005). Em estudo realizado nos EUA, o DNA de *M. haemofelis* e de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi constatado em *Ct. felis* obtido de um gato com co-infecção natural. Lappin et al. (2006) afirmaram em seu estudo, contudo, que a presença do DNA dos hemoplasmas em pulgas não permite que se afirme que estes organismos estavam viáveis e capazes de causar infecção.

Uma vez que já foi comprovado que o *M. haemocanis*, um hemoplasma canino geneticamente próximo ao *M. haemofelis*, pode ser transmitido com sucesso entre cães através do parasitismo por *Rhiphicephalus sanguineus* (SENEVIRATNA et al., 1973), o carrapato pode ser outro artrópode implicado como suspeito na transmissão de hemoplasmas ao gato. Um estudo realizado no Japão revelou a presença de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em carrapatos adultos da espécie *Ixodes ovatus*, os quais foram coletados na vegetação e, supostamente, não haviam ainda realizado hematofagia. Este achado sugere não somente o papel do carrapato como um possível vetor do hemoplasma, mas também levanta a possibilidade de que os carrapatos tenham se infectado ao realizar hematofagia no

estágio de ninfa, ou, ainda, que possa ocorrer transmissão transestadial (TAROURA et al., 2005). O DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' foi recentemente detectado em carrapatos do gênero *Ixodes* e em pulgas da espécie *Ct. felis* por WILLI et al. (2007b). Estes mesmos autores encontraram o DNA de '*Candidatus M. turicensis*' em um carrapato da espécie *R. sanguineus* coletado de um cão.

A transfusão de sangue contaminado com micoplasmas hemotrópicos felinos pode ser considerada uma importante forma de transmissão iatrogênica, uma vez que organismos de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' podem manter-se viáveis em sangue refrigerado em solução CPDA-1 por até, respectivamente, uma hora e uma semana (GARY et al., 2006). A recomendação para gatos doadores de sangue é de que sejam submetidos ao exame de PCR para hemoplasmas, e, caso o resultado seja positivo, excluídos do banco de doadores. O ideal é que estes animais não possuam acesso a ambientes externos, e que estejam submetidos a controle eficaz de ectoparasitas, a fim de se evitar que adquiram a infecção (REINE, 2004).

Em gatos domésticos experimentalmente infectados, o DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' foi detectado em sua saliva e glândulas salivares (DEAN et al., 2005). O DNA de '*Candidatus M. turicensis*' pôde ser detectado na saliva e nas fezes dos animais por até nove semanas pós-infecção (WILLI et al., 2007b). A pequena quantidade de DNA obtida dos animais infectados (menos de 400 cópias por reação) sugere que, para que ocorra a transmissão direta, seriam necessárias interações agressivas entre os gatos, mais intensas que a simples exposição oronasal, a qual ocorre através de lambidas mútuas e uso comum de recipientes de água e comida (WILLI et al., 2007b).

Pode ocorrer transmissão vertical de *M. haemofelis* em gatas apresentando doença clínica para suas ninhadas, mesmo na ausência de um vetor artrópode; ainda não se sabe em que momento se dá esta transmissão, porém alguns autores supõem que esta poderia ocorrer *in utero*, no momento do parto ou pelo aleitamento/cuidados maternos (HARVEY e GASKIN, 1977; HARVEY, 2006). Todavia, até o presente momento, não há estudos que comprovem e esclareçam detalhes desta via de transmissão.

### 2.3.3. Ciclo biológico

Embora o DNA de hemoplasmas já tenha sido amplificado a partir de artrópodes (SHAW et al., 2004; TAROURA et al., 2005; LAPPIN et al., 2006; WILLI et al., 2007b), a presença física de hemoplasmas no interior de possíveis vetores ainda não foi demonstrada (HARBUTT, 1963; THOMSETT, 1960; RIKIHISA et al., 1997). Uma vez que ainda não se estabeleceu a(s) espécie(s) que está(ão) implicada(s) atuando como hospedeiro invertebrado dos hemoplasmas felinos, ou mesmo como um simples vetor, não há informação acerca do seu papel no ciclo biológico.

A avaliação da ultra-estrutura de hemoplasmas felinos sugere que, no hospedeiro vertebrado, os organismos se replicam por duas maneiras distintas. Demaree e Nessmith (1972) identificaram dois parasitos aderidos à membrana eritrocitária no momento da divisão, sugerindo a ocorrência da fissão binária. Da mesma forma, foi observado o brotamento destes organismos, que permanecem presos à célula-mãe através de uma ponte citoplasmática. Membranas plasmáticas adjacentes a esta ponte dão ao conjunto uma aparência trilaminar. Próximo à membrana delimitante existente entre os indivíduos, as células-filhas, ou brotamentos, apresentam o início da formação de microtúbulos curtos e ocos. Com a maturação do brotamento, essa ponte citoplasmática desaparece, podendo-se evidenciar apenas os microtúbulos (DEMAREE e NESSMITH, 1972).

### 2.3.4. Aspectos clínicos da doença

De maneira geral, muitos autores consideram que as infecções por *M. haemofelis* geralmente produzem anemia e sinais clínicos da doença, enquanto que as por '*Candidatus M. haemominutum*' usualmente são inaparentes e causam mínimas alterações no hematócrito, a não ser naqueles casos em que há acometimento concomitante por FIV, FeLV ou neoplasias (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; MESSICK, 2004).

O mecanismo pelo qual o agente causa a anemia poderia ser explicado pelo fato de que a ligação do organismo aos eritrócitos expõe antígenos, os quais se localizavam previamente na superfície interna da membrana celular (HARVEY,

2006). Esta membrana alterada torna-se alvo do sistema imunológico do hospedeiro, com produção de anticorpos contra as hemácias.

Pode haver a produção de anticorpos anti-eritrocíticos e anti-hemoplasmas, os quais levam à hemólise extravascular (TASKER e LAPPIN, 2006). Na ocorrência da fixação do sistema complemento, mediada por anticorpos anti-hemoplasmas, a membrana eritrocítica pode sofrer danos, culminando com mínima hemólise intravascular (HARVEY, 2006). O teste de Coombs (anti-globulina direta) a 37° C pode apresentar um resultado positivo dentro do período de uma semana após a primeira parasitemia, mantendo-se, geralmente, positivo durante toda a fase aguda da doença (MESSICK, 2004; HARVEY, 2006).

Os hemoplasmas são capazes de se ligar, simultaneamente, a mais de um eritrócito, levando a um aumento no seqüestro das hemácias em determinados espaços vasculares limitados, que predispõe estes eritrócitos à fagocitose por macrófagos do sistema retículo-endotelial (SIMPSON et al., 1978). Este fenômeno também poderia explicar o rápido aumento do volume globular (VG), observado após o “clearance” dos organismos do sangue periférico (HARVEY e GASKIN, 1977). É possível que infecções por hemoplasmas aumentem as chances da hemoglobina felina formar cristalóides intraeritrocíticos, que presumidamente reduzem a capacidade dos eritrócitos de se deformarem, aumentando a possibilidade destes sofrerem fagocitose (SIMPSON et al., 1978).

#### 2.3.4.1. *Mycoplasma haemofelis*

Com a finalidade de facilitar o entendimento da doença causada por *M. haemofelis*, Harvey e Gaskin (1977) dividiram didaticamente a doença em quatro estágios ou fases: pré-parasitêmica, aguda, recuperação e portador (ou crônica).

A fase pré-parasitêmica dura de uma a três semanas após a infecção experimental intravenosa (IV), na qual o animal não apresenta sinais clínicos da doença. A fase aguda, por sua vez, é compreendida do primeiro até o último pico de parasitemia, com duração de, geralmente, um mês ou mais. Os parasitos são identificados no sangue de maneira cíclica, e, devido a parasitemias massivas, há a diminuição do VG. Na maioria dos animais, o número de parasitos aumenta entre um a cinco dias, até alcançar o pico, que é seguido de um rápido declínio da

parasitemia. A terceira fase (de recuperação) envolve o período entre o último pico parasitêmico e o restabelecimento dos valores de normalidade do VG, considerado pelos autores como sendo de 30%. Por fim, a fase de portador, também denominada de fase crônica, se trata do período compreendido entre o final da fase de recuperação até a completa eliminação do parasito.

A gravidade da doença pode variar entre indivíduos: alguns animais apresentam ausência de sinais clínicos e/ou uma anemia leve, enquanto que outros podem apresentar depressão profunda e anemia acentuada, podendo vir ao óbito (HARVEY, 2006).

#### 2.3.4.2. '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'

A infecção por '*Candidatus M. haemominutum*' determina sinais clínicos mínimos ou ausentes em gatos domésticos, não sendo associados com fatalidade. As alterações hematológicas, quando presentes, são mínimas, podendo ocorrer uma diminuição do VG e da leucometria, que se mantém dentro dos valores de referência para a espécie (FOLEY et al., 1998; LORIMIER e MESSICK, 2004).

Após a fase aguda de parasitemia, pode ocorrer uma série de ciclos infecciosos, caracterizando períodos de latência e recrudência da doença; durante esta, o VG pode diminuir drasticamente, levando à anemia (FOLEY et al., 1998). Na infecção natural, os sinais e sintomas mais comumente observados em animais doentes são: febre, anorexia, letargia e anemia. Em estudo realizado nos EUA com 21 gatos anêmicos e PCR-positivos para '*Candidatus M. haemominutum*', seis animais não apresentavam outra causa que justificasse seu quadro anêmico (REYNOLDS e LAPPIN, 2007). Alguns destes animais apresentaram melhora clínica ao receberem tratamento com doxiciclina, antibiótico com ação anti-hemoplasmas, reforçando a teoria de que o '*Candidatus M. haemominutum*' foi o patógeno responsável por esta condição de anemia (REYNOLDS e LAPPIN, 2007). Na Austrália, gatos naturalmente infectados com '*Candidatus M. haemominutum*' apresentaram, da mesma forma, valores de VG inferiores àqueles de animais PCR-negativos para hemoplasmas (TASKER et al., 2004).

Os gatos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' desenvolvem títulos de anticorpos da classe IgG, os quais, de alguma forma, possuem reação cruzada

com o *M. haemofelis*, protegendo-os contra a infecção por esta espécie (FOLEY, 2000).

#### 2.3.4.2. 'Candidatus Mycoplasma turicensis'

O primeiro relato de infecção pelo 'Candidatus *M. turicensis*' ocorreu em 2005, em um gato macho de 13 anos de idade na Suíça, apresentando intensa hemólise intravascular (WILLI et al., 2005). A transmissão experimental com a primeira passagem para um gato "specific pathogen free" (SPF) imunossuprimido pela administração prévia de metilprednisolona levou a uma severa anemia no animal, enquanto que a segunda passagem para um gato SPF imunocompetente causou apenas uma moderada diminuição do hematócrito. Também foi observado um aumento da fragilidade osmótica das hemácias (WILLI et al., 2005).

Gatos com co-infecção com outra espécie de hemoplasma apresentaram diminuição significativa dos valores de VG quando comparados aos animais negativos para hemoplasmas (WILLI et al., 2006a). Um estudo recente sugere que co-fatores, como imunossupressão iatrogênica ou induzida por retrovírus, co-infecção com outros hemoplasmas, bem como outros fatores ainda não definidos, estariam envolvidos no desenvolvimento de anemia em gatos infectados por 'Candidatus *M. turicensis*' (WILLI et al., 2006a; 2006b).

#### 2.3.5 Alterações hematológicas e na bioquímica sérica

O hematócrito do gato está usualmente abaixo de 20% e freqüentemente abaixo de 10%, antes que os sinais clínicos da doença possam ser percebidos por seu proprietário. Este parâmetro não é um bom indicador da massa eritrocitária total em gatos com micoplasmoses hemotrópicas, pois as hemácias parasitadas podem ser seqüestradas no baço, pulmões, fígado e medula óssea, e após a remoção dos organismos da sua superfície essas células retornam à circulação (JAIN, 1993b; HARVEY, 2006).

Mesmo quando o VG diminui drasticamente, o volume globular médio (VGM) tende a se manter dentro dos valores de referência para a espécie, e poucos

reticulócitos estão presentes na circulação. Na maioria dos casos, quando os sinais clínicos da doença se tornam evidentes, o gato apresenta uma anemia regenerativa, com anisocitose, policromasia e reticulocitose. Eritrócitos nucleados podem estar presentes. Mais tardiamente, pode ser observada macrocitose (aumento do VGM) em alguns gatos, geralmente associada à hipocromia, com valores de concentração de hemoglobina globular média (CHGM) menores que 31g/dL. Na maioria dos casos, corpúsculos de Howell-Jolly também estão presentes durante a fase aguda, mas, na espécie felina, estas estruturas também são comumente observadas em esfregaços de animais sadios. A técnica para contagens de reticulócitos não é eficaz, pois a preparação com novo azul de metileno, utilizada nesta metodologia, também evidencia os parasitos, tornando então impossível realizar a diferenciação entre os reticulócitos ponteados e os hemoplasmas. A plaquetometria geralmente está dentro dos valores de referência (HARVEY, 2006).

A auto-aglutinação é freqüentemente observada em amostras de sangue refrigeradas durante a fase aguda das hemoplasmoses (ZULTY e KOCIBA, 1990), muito embora o significado clínico de imunoglobulina M (IgM)-aglutininas frias não esteja claro (BÜCHELER e GIGER, 1991).

No mielograma de gatos com manifestações clínicas de hemoplasmoses, a relação mielóide:eritróide (M:E) se apresenta dentro da normalidade no início da doença, com tendência à diminuição em estágios mais avançados. A hiperplasia eritróide é manifestada não somente pelo aumento do número total de células eritróides, mas também pelo aumento proporcional de células em estágios imaturos. Discreta a moderada eritrofagocitose por macrófagos pode ser observada (JAIN, 1993b; HARVEY, 2006).

Quanto às alterações no leucograma, as contagens totais ou diferenciais são bastante variáveis e de limitado valor diagnóstico, embora o aumento da atividade de monócitos possa ser observado (HARVEY e GASKIN, 1977; FOLEY et al., 1998). Eritrofagocitose por monócitos ou macrófagos pode ser observada em esfregaços sanguíneos examinados por microscopia óptica em menor aumento (HARVEY, 2006). Em alguns casos, durante a fase aguda da doença, pode ocorrer neutrofilia com DNNE leve e regenerativo (FLINT et al., 1958), enquanto que na fase de recuperação pode ocorrer uma neutropenia moderada (FOLEY et al., 1998).

A icterícia plasmática não é um achado comum em casos de micoplasmose hemotrópica felina. Contudo, pode estar presente de um a dois dias após uma



rápida diminuição do hematócrito, provavelmente porque os eritrócitos são seqüestrados nos capilares e espaços vasculares do baço sem que sejam destruídos (HARVEY, 2006). Do contrário, se houver uma grande destruição de eritrócitos por macrófagos destes espaços, a icterícia pode se estabelecer devido à hemólise extravascular (HARVEY e GASKIN, 1977).

A concentração de proteínas plasmáticas totais está geralmente dentro dos valores de referência, mas, em alguns casos, pode esta aumentada imediatamente após um episódio parasitêmico (GASKIN, 1977; HARVEY, 2006; HARVEY e WILLI et al., 2006a; WILLI et al., 2007c).

O aumento na atividade das enzimas hepáticas pode ser atribuído à hipóxia secundária à anemia, ou a uma lipidose hepática devido à anorexia. O aumento discreto a moderado na concentração sérica de uréia pode ser pré-renal, secundário à desidratação (HARVEY, 2006; WILLI et al., 2007c). A glicemia pode estar diminuída em animais moribundos (HARVEY, 2006).

#### 2.3.6. Diagnóstico

Os organismos de *M. haemofelis* estão presentes em número suficiente para serem reconhecidos em esfregaços de sangue corados em somente 50% do tempo durante a fase aguda da doença (HARVEY, 2006), fato que contribui para uma baixa sensibilidade do método de avaliação do esfregaço sangüíneo, calculada como menor que 50% quando comparada aos resultados obtidos através da técnica de PCR (WESTFALL et al., 2001).

A confecção de esfregaços sangüíneos imediatamente após a coleta de sangue colabora para minimizar as chances de um diagnóstico falso-negativo, pois os organismos podem se soltar dos eritrócitos durante o armazenamento da amostra com ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (JAIN, 1993b). É recomendado o emprego de corantes do tipo Romanowsky, como Wright, Giemsa e combinações, pois a coloração pelo panótico rápido pode dificultar a visualização dos hemoplasmas (ALLEMAN et al., 1999).

Podem ser observados um ou mais organismos aderidos à superfície dos eritrócitos (SMALL e RISTIC, 1967), sendo também possível visualizá-los livres no plasma (FLINT e MOSS, 1953; FLINT e MCKELVIE, 1955). Os organismos são

altamente pleomórficos, e são descritas formas semelhantes a pequenos anéis, raquetes, vírgulas ou cocos (FLINT e MOSS, 1953; FLINT e MCKELVIE, 1955; FLINT et al., 1958; HARBUTT, 1963; HARVEY e GASKIN, 1977; SIMPSON et al., 1978; RIKIHISA et al., 1997; BERENT et al., 1998; MESSICK et al., 1998; ALLEMAN et al., 1999; BERENT et al., 2000). Na espécie *M. haemofelis*, as formas cocóides podem formar correntes por sobre a célula, sendo que os organismos localizados no final da corrente tendem a ser maiores do que os demais (FLINT e MCKELVIE, 1955). A coloração dos organismos corados por Giemsa varia de intensamente roxa a tons de violeta (SMALL e RISTIC, 1967). As formas cocóides apresentam tamanhos variando entre 0,1 e 0,8 $\mu$ m, medindo, em média, 0,2 a 0,3 $\mu$ m (FLINT e MCKELVIE, 1955; FLINT et al., 1958). De acordo com Small e Ristic (1967), os organismos arredondados medem de 0,3 a 0,5 $\mu$ m de diâmetro.

Resultados falso-positivos na visualização dos organismos são passíveis de ocorrer quando os hemoplasmas são confundidos com precipitados de corante, artefatos decorrentes da secagem do esfregaço sangüíneo, corpúsculos de Howell-Jolly, ponteados basofílicos, inclusões siderocíticas e protozoários do gênero *Cytauxzoon* (HARVEY, 2006).

A microscopia eletrônica de secções ultrafinas e de preparações do tipo “shadow-cast”, além de técnicas de coloração por laranja de acridina e por anticorpo anti-hemoplasma fluorescente, já foram utilizadas com sucesso na visualização dos hemoplasmas (SMALL e RISTIC, 1967; BOBADE e NASH, 1987), mas a visualização dos organismos em esfregaços sangüíneos com colorações do tipo Romanowsky ainda é a técnica utilizada na rotina (HARVEY, 2006).

A PCR consiste numa técnica molecular altamente sensível, capaz de amplificar exponencialmente um fragmento de DNA até que o número de cópias deste fragmento atinja níveis detectáveis. As seqüências-alvo dos protocolos de PCR para diagnóstico de hemoplasmas são trechos da menor subunidade (16S) do RNA ribossomal (rRNA) do parasito (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; MESSICK et al., 1998; FOLEY e PEDERSEN, 2001; JENSEN et al., 2001; TASKER e LAPPIN, 2001).

Ensaio de PCR altamente sensíveis vêm sendo desenvolvidos para a detecção de micoplasmas hemotrópicos no sangue de gatos, e resultados positivos são obtidos mesmo com um pequeno número de parasitos na amostra, situação em que o diagnóstico através da visualização dos organismos por microscopia óptica

não é possível (MESSICK et al., 1998; JENSEN et al., 2001; HARVEY, 2006). Através do uso da técnica de PCR competitivo-qualitativo, foi possível detectar o DNA de apenas 52 organismos no sangue (COOPER et al., 1999). A técnica de PCR quantitativo também permite avaliar a eficácia do tratamento da infecção por hemoplasmas, pois consegue determinar a diminuição ou ausência do número de cópias de DNA presente no sangue do paciente após instituição de tratamento específico (TASKER et al., 2006).

Seria interessante submeter à técnica de PCR apenas amostras coletadas previamente à instituição da terapia antimicrobiana específica, pois, em gatos experimentalmente infectados, os resultados da PCR foram positivos de quatro a quinze dias pós-infecção, e mantiveram-se positivos até o início da terapia antimicrobiana, que pode diminuir o número de parasitas e gerar resultados falso-negativos (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001).

### 2.3.7. Tratamento

A transfusão de sangue total é indicada em gatos com valores de VG inferiores a 12-15% (NORSWORTHY, 1998; TASKER e LAPPIN, 2002). Em casos graves, é recomendado o tratamento de suporte com fluidoterapia parenteral acrescida de glicose. O suporte nutricional através da alimentação por sonda orogástrica ou nasogástrica pode ser instituído em alguns casos, até que o animal volte a alimentar-se de forma independente (NORSWORTHY, 1998).

Embora a antibioticoterapia com doxiciclina, enrofloxacina ou marbofloxacina seja capaz de diminuir o número de organismos no sangue e causar a remissão dos sinais clínicos em gatos infectados com hemoplasmas (BERENT et al., 1998; FOLEY et al. 1998, TASKER et al., 2006), nenhum tratamento foi capaz de eliminar a infecção consistentemente.

O tratamento com tetraciclina pode induzir febre e/ou doença no trato gastrointestinal em gatos (MCGROTTY e KNOTTENBELT, 2002). O uso de corticosteróides é controverso em casos de infecção por hemoplasmas, mas diante de uma suspeita de anemia hemolítica imunomediada intensa, pode-se optar pela administração de prednisolona, juntamente com antibioticoterapia apropriada (WILLI et al., 2007c).

### 2.3.8. Prognóstico

O prognóstico para infecções por hemoplasmas em felinos é variável, e depende da espécie de hemoplasma infectante, da susceptibilidade do hospedeiro, do grau e da reposta à anemia, da presença de doenças concomitantes e/ou co-infecção com FeLV/FIV ou por outras espécies de hemoplasmas (MESSICK, 2004; TASKER e LAPPIN, 2006; WILLI et al., 2007c).

Para animais infectados com *M. haemofelis* que apresentem anemia hemolítica acentuada, o prognóstico é de reservado a desfavorável. Na fase aguda não-complicada da doença, até um terço dos gatos infectados que não recebem tratamento pode morrer, devido à profunda anemia. Os animais que se recuperam são aqueles que conseguem compensar a anemia com uma resposta regenerativa da medula óssea, além de desenvolver uma resposta imunológica eficiente contra o organismo (HARVEY, 2006). Em casos de crises hemolíticas graves, o animal pode vir ao óbito. Em infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' não complicadas por outras doenças, o prognóstico é favorável (FOLEY et al., 1998).

### 2.3.9. Prevenção

Considerando-se os possíveis modos de transmissão dos hemoplasmas e os fatores de risco já conhecidos, seria prudente evitar o acesso dos felinos a ambientes externos, manter um controle eficaz de ectoparasitas e minimizar possíveis agressões entre os gatos (WILLI et al., 2007b).

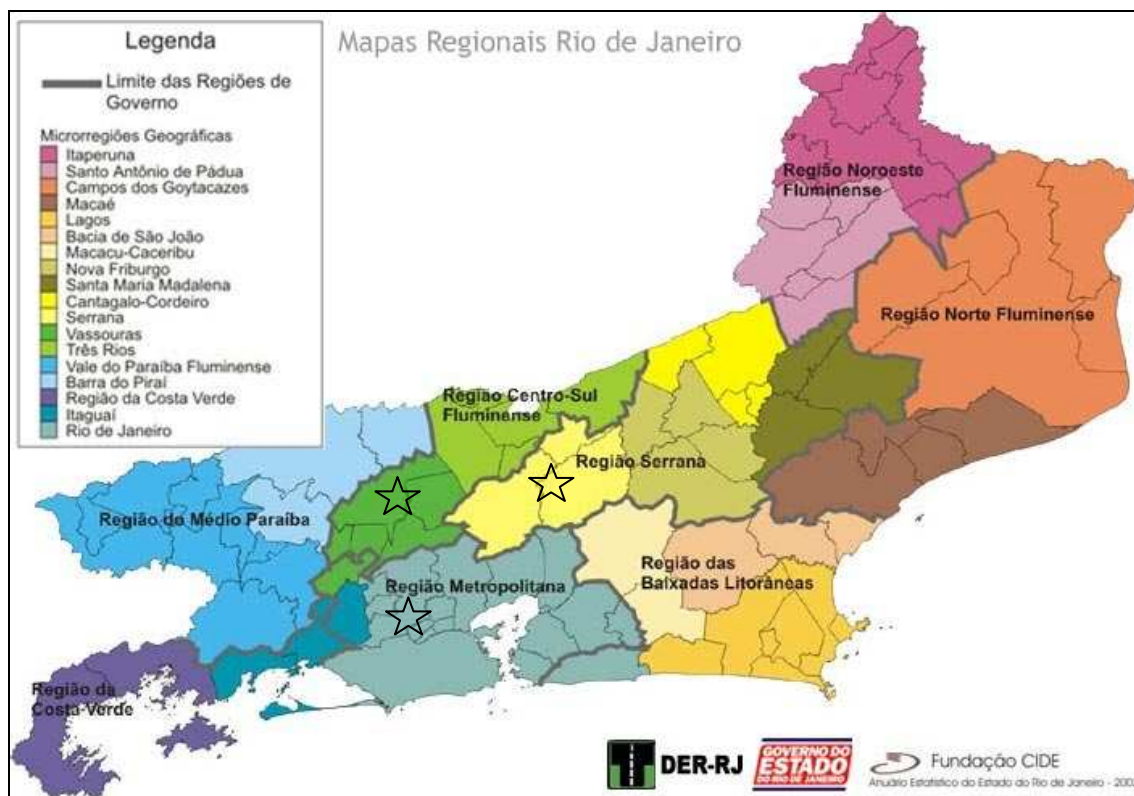
Animais infectados por hemoplasmas, tratados ou não, geralmente se mantêm portadores assintomáticos, com parasitemia baixa e persistente (HARVEY e GASKIN, 1978; BERENT et al., 1998; MESSICK et al., 1998), e podem ser considerados como uma fonte de infecção para os possíveis vetores ou para outros gatos. Animais PCR-positivos para hemoplasmas não devem ser utilizados como doadores de sangue (REINE, 2004) ou na reprodução.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram investigados gatos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758), machos e fêmeas, de idade e raças variadas, procedentes das regiões Metropolitana, Centro-sul Fluminense e Serrana. A localização geográfica destas regiões no Estado do Rio de Janeiro encontra-se ilustrada na figura 1.

Os proprietários cujos gatos tiveram amostras coletadas exclusivamente para este estudo assinaram termo de autorização para a coleta de sangue de seus animais.



**Figura 1:** Mapa das regiões do Estado do Rio de Janeiro. As estrelas indicam as regiões Metropolitana, Centro-sul Fluminense e Serrana, abordadas neste estudo.

Fonte: <http://www.rio-turismo.com/mapas/regioes.htm>

### 3.2. Amostras

Foram obtidas por conveniência 207 amostras de sangue venoso, recolhidas em frascos siliconizados (uma por animal) contendo o anticoagulante EDTA. Estas foram divididas em três grupos distintos, de acordo com sua origem: Metropolitana (n=159), Centro-sul (n=37) e Serrana (n=11).

Para a pesquisa de hemoparasitas, foram confeccionados esfregaços de sangue no momento da coleta, além de esfregaços de sangue capilar (ponta-de-orelha),

Os hemogramas das amostras obtidas de laboratórios comerciais foram realizados nos mesmos, enquanto que aquelas coletadas para este estudo foram encaminhadas (em caixa térmica contendo gelo) ao Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UFF. Em ambos os casos, os hemogramas e a fixação das lâminas para pesquisa de hemoparasitos em metanol foram realizados no mesmo dia da coleta do material.

Imediatamente após a realização dos hemogramas, alíquotas das amostras de sangue total foram separadas em microtubos, as quais foram mantidas e transportadas sob refrigeração (4°C) para as instalações do Laboratório de Bactérias Enteropatógenicas e Microbiologia de Alimentos da UFF. Neste local, permaneceram congeladas em freezer na temperatura de 20°C negativos, até que seu DNA genômico fosse extraído.

### **3.3. Processamento das amostras**

#### **3.3.1. Hemogramas**

Os hemogramas foram realizados em contador automático de células modelo T-890<sup>®</sup> (Coulter Electronics Inc., Hialeah-FL, EUA), sendo o hematócrito obtido após centrifugação em microcentrífuga modelo H240<sup>®</sup> (Centribio Zhengji Instruments Co. LTA, Jiangsu, China).

A concentração de proteínas plasmáticas totais foi aferida por refratometria, não tendo sido possível, contudo, obter este parâmetro de 10 animais da região Serrana, devido à metodologia adotada pelo laboratório onde as amostras deste grupo foram processadas.

Os esfregaços sanguíneos provenientes de sangue circulante foram corados pela técnica rápida Instant-Prov<sup>®</sup> (Newprov Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais-PR, Brasil) e os esfregaços de sangue capilar por solução de Giemsa (Merck SA, São Paulo-SP, Brasil). Sua avaliação à microscopia óptica permitiu a diferenciação morfológica dos leucócitos, a avaliação dos eritrócitos e a confirmação dos resultados obtidos pela contagem automática, e, quando presentes, a observação de alterações da morfologia celular e a presença de hemoparasitas.

Os valores de referência utilizados para os parâmetros hematológicos encontram-se agrupados no Anexo 1.

### 3.3.2. Extração do DNA genômico

As extrações do DNA das amostras de sangue total foram realizadas no Laboratório de Bactérias Enteropatogênicas e Microbiologia de Alimentos, no Instituto Biomédico da UFF, utilizando-se o “kit” comercial “Illustra™ GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit” (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont-Bucks, Inglaterra), seguindo-se as orientações do fabricante. A fim de evitar contaminações, esta etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical VLFS-9® (VECO, Campinas-SP, Brasil), sendo utilizadas pipetas automáticas com ponteiros de filtro-barreira estéreis, livres de Dnase/ Rnase, ATP e pirogênios. As amostras contendo o DNA extraído foram armazenadas a 20°C negativos até o momento da sua utilização para as PCR, conduzidas no mesmo laboratório.

### 3.3.3. Ensaio de PCR para amplificação da seqüência genética de *Cytauxzoon felis*

O DNA total obtido de cada amostra foi testado para a presença de seqüência genética da espécie *C. felis* utilizando-se os iniciadores ou “primers” *C. felis*-F (“forward”) e *C. felis*-R (“reverse”) (BIRKENHEUER et al., 2006) que amplificam um fragmento específico do gene codificador da unidade 18S do RNA ribossomal, originando um produto de 284 pares de bases (pb) (Tabela 3).

### 3.3.4. Ensaio de PCR “seminested” para amplificação das seqüências genéticas de *Babesia* spp e *Theileria* spp

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de seqüências genéticas dos gêneros *Babesia* e *Theileria* utilizando-se os iniciadores ou “primers” BT-F1 (“forward”) e BT-R1 (primeiro “reverse”) e BT-R2 (segundo “reverse”) (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) que amplificam um fragmento específico do gene codificador da unidade 18S do RNA ribossomal, originando um produto de aproximadamente 395 pb para *Babesia* spp e 410 pb para *Theileria* spp (Tabela 3).



### 3.3.5. Ensaio de PCR para amplificação das seqüências genéticas de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum'

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de seqüência genética das espécies *M. haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*' utilizando-se os iniciadores ou "primers" HBT-F ("forward") e HBT-R ("reverse") (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) que amplificam um fragmento específico do gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal, originando um produto de 595 pb para *M. haemofelis* e 618 pb para 'Candidatus *M. haemominutum*' (Tabela 3).

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados para a detecção de *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp/*Theileria* spp e hemoplasmas em gatos domésticos, seqüências dos iniciadores, genes-alvo, tamanhos aproximados dos produtos da PCR, número de acesso das seqüências genéticas depositadas no GenBank\* e referências.

Iniciadores	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Gene-alvo	Tamanho aproximado do produto (pb)	Número de acesso no GenBank*	Referência
<i>C. felis</i> -F	GCGAATCGCATTGCTTTATGCT	18s rRNA <i>C. felis</i>	284	L19080, AY679105, AY531524, AY39930	Birkenheuer et al., 2006
<i>C. felis</i> -R	CCAATTGATACTCCGGAAAGAG				
BT-F1	GGT TGA TCC TGC CAG TAG T	18s rRNA	<i>Babesia</i> spp: 395	L19079	Criado-Fornelio et al., 2003
BT-R1	GCC TGC TGC CTT CCT TA	<i>Babesia</i> e	<i>Theileria</i> spp: 410		
BT-R2	TTG CGA CCA TAC TCC CCC CA	<i>Theileria</i> spp			
HBT-F	ATACGGCCCATATTCCTACG	16s rRNA <i>Mycoplasma</i> <i>haemofelis</i> e	<i>M. haemofelis</i> : 595	AF178677	Criado-Fornelio et al., 2003
HBT-R	TGCTCCACCACTTGTTCA	' <i>Candidatus</i> M. haemominutum'	' <i>Candidatus</i> M. haemominutum': 618		

\*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

### 3.3.6. Controles positivos e negativos das PCR

Para todas as reações foram utilizados dois controles positivos e um negativo previamente conhecidos.

Os controles de *C. felis* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, do Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ.

Como controles de *Babesia* spp, utilizados na reação *Babesia-Theileria* spp, foram utilizadas amostras positivas e seqüenciadas (SÁ et al., 2006), pertencentes ao banco de DNA do grupo de pesquisa de hemoparasitos da UFF.

Os controles das duas espécies de micoplasmas hemotrópicos (*M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’) foram gentilmente cedidos pela aluna de Mestrado Ana Márcia de Sá Guimarães, da USP, e pelo Prof. Dr. Alexander W. Biondo, seu co-orientador, da UFPR.

### 3.3.7. Preparo das misturas das PCR

Com o objetivo de minimizar ao máximo o risco de contaminação, as misturas para PCR foram preparadas em câmara modelo 825-PCR-UVC Chamber<sup>®</sup> (Plas Labs Inc, Lansing-MI, EUA), própria para esta finalidade, além de pipetas automáticas diferentes daquelas utilizadas na etapa de extração do DNA, com ponteiras de filtro-barreira estéreis, livres de Dnase/ Rnase, ATP e pirogênios.

Cada reação continha 5 µl da solução de DNA para um volume final de 25 µl. Foram utilizados 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo-SP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,4 (Invitrogen do Brasil, São Paulo-SP), 1,0 µM de cada iniciador (Invitrogen Corporation, Carlsbad-CA, EUA), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen Corporation, Carlsbad-CA, EUA), e água Milli-Q estéril q.s.p. 25 µl.

A reação *Babesia-Theileria* spp consiste em uma reação “seminested”, que tem mistura idêntica à descrita no parágrafo anterior, à exceção dos “primers”, contendo 1,0 µM dos “primers” BT-F1 e BT-R1 e 0,01 µM do “primer” BT-R2.

### 3.3.8. Condições das PCR

As amplificações foram realizadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research®, INC, Waltham, EUA), e foram mantidas sob refrigeração (4°C) após o término da etapa de extensão final.

As condições da reação de PCR para *C. felis* foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 45 s, 59°C por 45 s, 72°C por 60 s, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos (BIRKENHEUER et al., 2006).

As condições da reação *Babesia-Theileria* spp foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 min; primeira amplificação com 30 ciclos de 95°C por 30 s e 65°C por 1 min 30 s; segunda amplificação com 30 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s; seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. Devido ao ajuste das temperaturas de anelamento, na primeira amplificação apenas os primers BT-F1 e BT-R2 anelam-se ao DNA; na segunda amplificação (“seminested”), que tem uma temperatura de anelamento mais baixa, os três primers anelam-se, embora apenas aqueles em maior concentração (BT-F1 e BT-R1) consigam gerar quantidade significativa de produto amplificado (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

As condições da reação de PCR para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

As condições das PCR para *C. felis*, *Babesia* e *Theileria* spp, e Hemoplasmas estão dispostas na tabela 4.

**Tabela 4:** Condições das PCR para *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp, e Hemoplasmas.

Condições das PCR	<i>Cytauxzoon felis</i> <sup>a</sup>	<i>Babesia</i> spp e	
		<i>Theileria</i> spp ("seminested") <sup>b</sup>	Hemoplasmas <sup>b</sup>
<b>Desnaturação inicial</b>	95°C por 5 min	94°C por 10 min	94°C por 10 min
<b>Amplificação</b>	40 ciclos	30 ciclos	40 ciclos
	95°C por 45 s	95°C por 30 s	95°C por 30 s
	59°C por 45 s	65°C por 90 s	60°C por 30 s
	72°C por 60 s		72°C por 30 s
		30 ciclos	
		95°C por 30 s	
		60°C por 30 s	
		72°C por 30 s	
<b>Extensão final</b>	72°C por 5 min	72°C por 10 min	72°C por 10 min

<sup>a</sup> Birkenheuer et al., 2006.<sup>b</sup> Criado-Fornelio et al., 2003.

### 3.3.9. Visualização dos resultados das PCR

Para visualização dos resultados foi adicionada aos produtos amplificados uma solução contendo azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 60%, após o que os amplicons foram colocados em gel de agarose 1% (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway-NJ, EUA) previamente solidificado, sendo submetidos à eletroforese em cuba horizontal modelo CBS-MGV502T<sup>®</sup> (CBS Scientific Company Inc., Del Mar-CA, EUA) por aproximadamente 60 minutos a 115 volts em fonte EPS-250<sup>®</sup> do mesmo fabricante. O tampão de corrida utilizado era a solução Tris-Borato-EDTA (TBE 1x) pH 8,2 (Tris a 0,5 M, Borato a 0,045 M e EDTA a 1 mM). Após o término da eletroforese, a coloração do gel era realizada mergulhando-se o mesmo em uma solução de brometo de etídeo 0,01% (Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA) por 15 minutos para posterior visualização em transluminador ultra-violeta TCX20-M<sup>®</sup> (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França). Fotografias para documentação foram obtidas através do sistema para obtenção de fotos digitais DigiDoc-It<sup>®</sup> Imaging System (UVP/ LLC, Upland-CA, EUA). Para determinação dos tamanhos dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA).

### 3.3.10. Digestão de amplicons de *Babesia* spp/*Theileria* spp com enzima de restrição *Hind*III

A confirmação da natureza dos produtos amplificados se faz necessária diante da relativa inespecificidade dos “primers” utilizados neste protocolo. Não há sítio para a endonuclease *Hind*III no DNA de mamíferos ou de fungos, estando o mesmo presente somente no DNA de piroplasmídeos (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

A digestão foi realizada adicionando-se a cada 10 µl de amplicon 10 U da enzima, e esta mistura mantida em banho-maria a 37°C por duas horas, após o que eram necessários os mesmos procedimentos descritos no item 3.3.9.

A digestão do DNA de *Babesia* spp com *Hind*III dá origem a dois fragmentos de tamanhos 65 e 330 pb, enquanto que a digestão do DNA de *Theileria* spp gera dois fragmentos de 65 e 345 pb. Devido à proximidade dos tamanhos dos produtos, não é possível determinar a espécie do piroplasmídeo, sendo necessário realizar o seqüenciamento das amostras positivas para o diagnóstico definitivo (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

### 3.3.11. Digestão de amplicons de *Mycoplasma* spp com enzima de restrição *Eco*RI

Devido à proximidade dos tamanhos das bandas das duas espécies estudadas (595 pb para *M. haemofelis* e 618 pb para *M. haemominutum*), a diferenciação entre espécies só foi possível através da digestão dos amplicons positivos (banda de aproximadamente 600 pb) com a enzima de restrição *Eco*RI (Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA).

A digestão foi realizada adicionando-se a cada 10 µl de amplicon 10 U da enzima, e esta mistura mantida em banho-maria a 37°C por duas horas, após o que eram necessários os mesmos procedimentos descritos no item 3.3.9.

A visualização de duas bandas de pesos moleculares de 269 e 349 pb representa a digestão do DNA, e caracteriza a espécie ‘*Candidatus*’ *M. haemominutum*, que possui um sítio para a digestão pela enzima *Eco*RI, enquanto que a ausência de sítios para a digestão pela enzima de restrição utilizada é própria

da espécie *M. haemofelis*, na qual a banda de aproximadamente 600 pb permanece intacta (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

### 3.4. Análise estatística

Comparações entre as variáveis aferidas nos grupos das regiões Metropolitana, Centro-sul e Serrana foram confrontadas com as mesmas no grupo de referência através dos testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), exato de Fisher, quando aplicável (variáveis com respostas categóricas), ou Mann-Whitney (variáveis contínuas). Entende-se por grupo de referência os animais PCR-negativos para o hemoparasito em cada região geográfica estudada.

Estimativas de ocorrência obtidas através de teste exato para proporção binomial e intervalos de confiança (IC) exatos a 95% foram calculados para piroplasmas e hemoplasmas em cada grupo, e reportados como porcentagens de gatos com um resultado de teste positivo (número de gatos testados positivos dividido pelo número total de gatos testados x 100).

Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos para todos os testes neste estudo. A análise estatística foi realizada por meio dos programas SAS<sup>®</sup> 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA) e SPSS<sup>®</sup> 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA) e Stata 9.0 (Stata Inc, College Station, TX, EUA).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram utilizadas amostras de sangue de 207 gatos, a partir das quais foram realizados o hemograma, a avaliação de esfregaços sangüíneos para pesquisa de hemoparasitos e o diagnóstico molecular. O parâmetro proteínas plasmáticas totais (PPT) por refratometria foi obtido de apenas um dos onze animais da região Serrana, devido à metodologia adotada pelo laboratório onde as amostras deste grupo foram processadas. O total de observações absolutas válidas para cada parâmetro analisado nas 207 amostras obtidas encontra-se alocado, de acordo com a região de origem, na tabela 5.

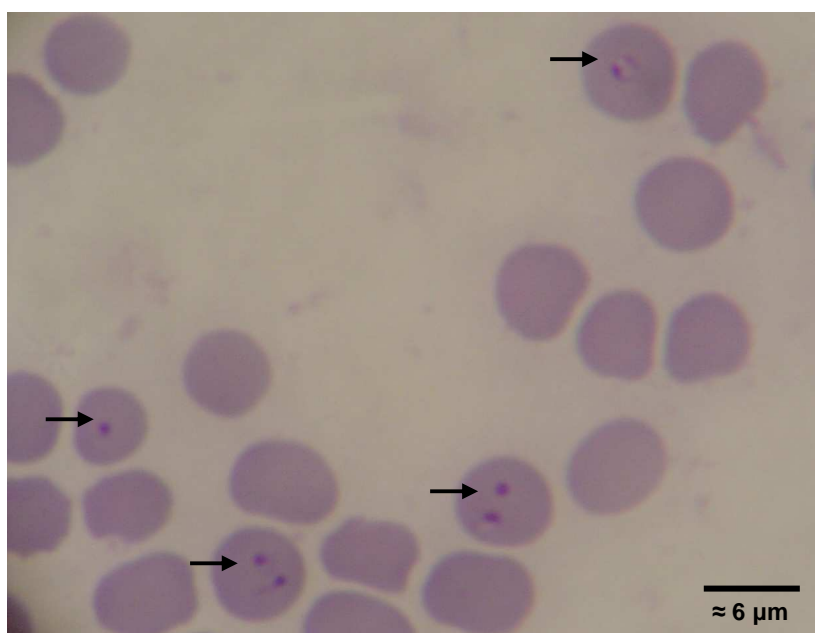
**Tabela 5:** Total de observações absolutas válidas dos parâmetros dos 207 gatos, alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Parâmetros	Local de coleta			Total (n=207)
	Metropolitana (n=159)	Centro-sul (n=37)	Serrana (n=11)	
VG	159	37	11	207
Hematimetria	159	37	11	207
Hemoglobinometria	159	37	11	207
VGM	159	37	11	207
CHGM	159	37	11	207
LG	159	37	11	207
Plaquetometria	159	37	11	207
PPT	159	37	01	197
Pesquisa de hemoparasitos	159	37	11	207
PCR <i>C. felis</i>	159	37	11	207
PCR <i>Babesia</i> spp e <i>Theileria</i> spp	159	37	11	207
PCR Hemoplasmas	159	37	11	207

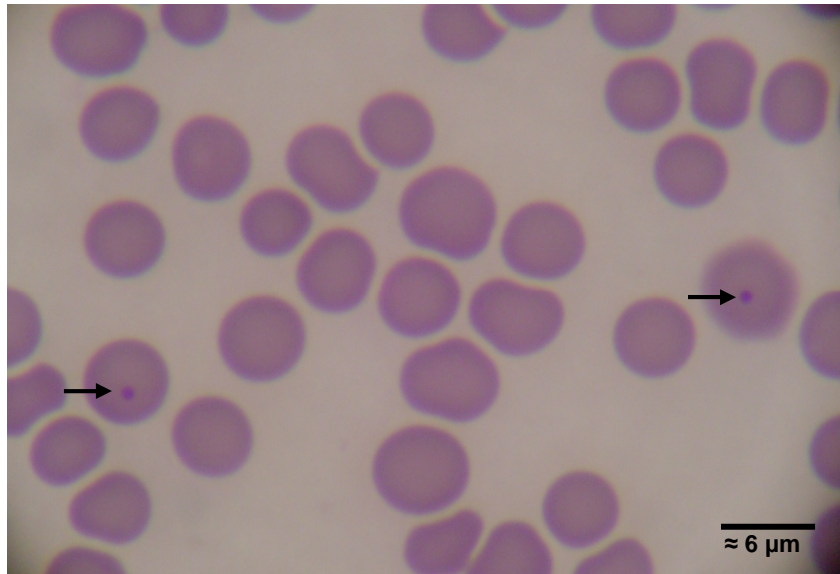


#### 4.1. Resultado da pesquisa morfológica da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas

A pesquisa de hemoparasitas em esfregaços de sangue total e periférico (ponta de orelha) revelou que um dos 207 gatos (0,48%; 1/207) apresentou formas intraeritrocitárias de piroplasmas (Figura 2), enquanto dois dos 207 gatos (0,97%; 2/207) apresentaram formas intraeritrocíticas de hemoplasmas (Figura 3). Não houve diferença significativa entre as três populações estudadas (regiões Metropolitana, Centro-Sul e Serrana) quanto à presença de hemoparasitas ( $p > 0,05$ ).



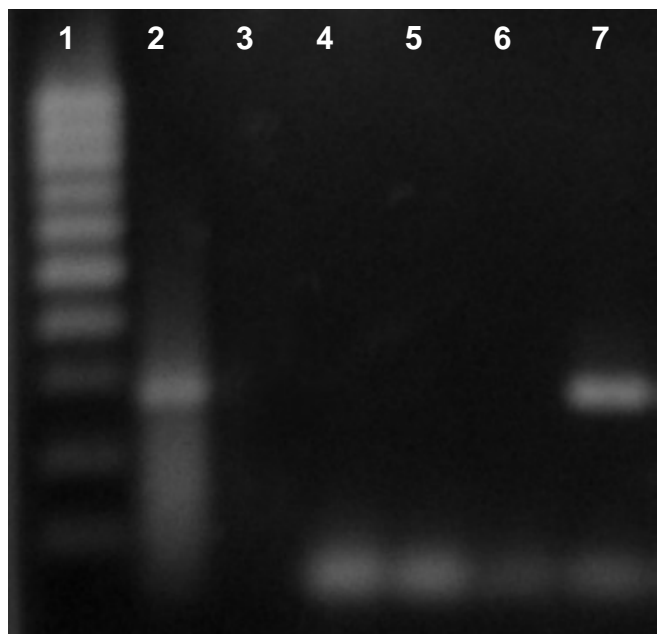
**Figura 2:** Esfregaço sangüíneo com formas intraeritrocíticas de piroplasmas (indicadas por setas) parasitando hemácias de gato. Coloração: Giemsa. Aumento: 1000X.



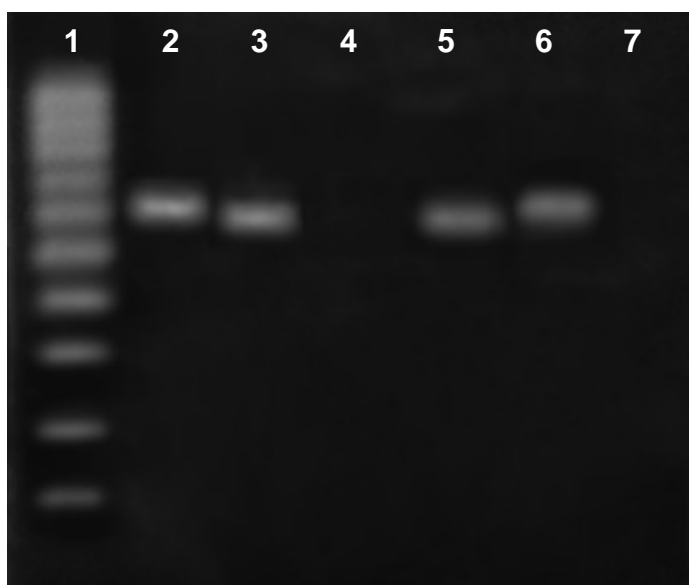
**Figura 3:** Esfregaço sangüíneo com formas epierythrocyticas de hemoplasmas (indicadas por setas) parasitando hemácias de gato. Observa-se, também, discreta anisocitose. Coloração: Giemsa. Aumento: 1000X.

#### 4.2. Resultados da pesquisa molecular da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas

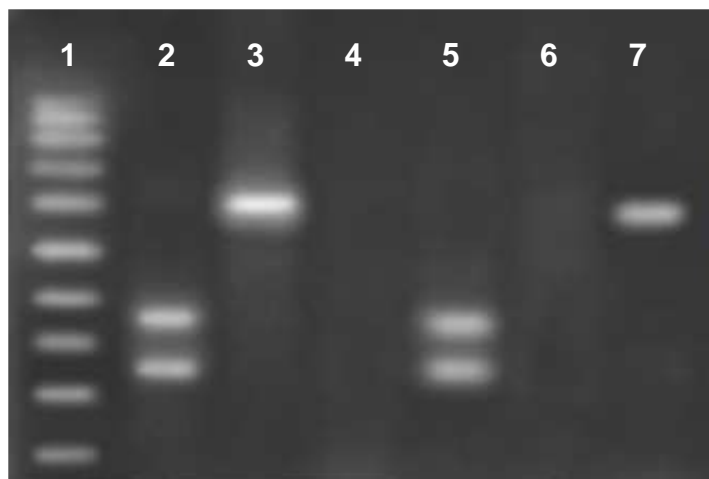
No protocolo para detecção do DNA de *C. felis*, o produto visualizado apresentou aproximadamente 284 pb (Figura 4). Já no protocolo para detecção de hemoplasmas, os produtos visualizados eram de aproximadamente 595 pb para *M. haemofelis* e de 618 pb para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (Figura 5). Os resultados positivos para DNA de hemoplasmas, após digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, apresentavam uma banda de peso molecular de 595 pb para *M. haemofelis* e duas bandas de 269 pb e 349 pb para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (Figura 6).



**Figura 4:** Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 18S do RNA ribossomal de *Cytauxzoon felis* ( $\approx$  284 pb). (1) Marcador de peso molecular-100 bp DNA Ladder; (2) Controle positivo para *C. felis*; (3) Controle negativo para *C. felis*; (4-6) Amostras negativas para *C. felis*; (7) Amostra positiva para *C. felis*.



**Figura 5:** Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S do RNA ribossomal de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*' ( $\approx$  600 pb). (1) Marcador de peso molecular-100 bp DNA Ladder; (2) Controle positivo para 'Candidatus *M. haemominutum*'; (3) Controle positivo para *M. haemofelis*; (4) Controle negativo para hemoplasmas; (5) Amostra positiva para *M. haemofelis*; (6) Amostra positiva para 'Candidatus *M. haemominutum*'; (7) Amostra negativa para hemoplasmas.



**Figura 6:** Resultados obtidos a partir da clivagem do produto de amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S do RNA ribossomal de com enzima de restrição *EcoRI*. (1) Marcador de peso molecular-100 bp DNA Ladder; (2) Controle positivo para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'; (3) Controle positivo para *M. haemofelis*; (4) Controle negativo para hemoplasmas; (5) Amostra positiva para '*Candidatus M. haemominutum*'; (6) Amostra negativa para hemoplasmas; (7) Amostra positiva para *M. haemofelis*.

#### 4.2.1. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de piroplasmas

A avaliação molecular das 207 amostras para os hemoparasitos *C. felis*, *Babesia* spp e *Theileria* spp revelou a ocorrência de uma amostra positiva para o piroplasma *C. felis* (0,48% ou 1/207). Não houve resultado positivo para os piroplasmas dos gêneros *Babesia* e *Theileria*. Na tabela 6 estão representados os resultados descritivos completos acerca da ocorrência de infecções por *C. felis* testados, com intervalos de confiança a 95%.

**Tabela 6:** Ocorrência de *Cytauxzoon felis* diagnosticado por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região	<i>Cytauxzoon felis</i> (PCR)		Total (%)
	Positivos	Negativos	
Metropolitana			
n (%)	0 (0)	159 (100)	159 (100)
IC 95%*	[0,0 – 2,3]*	[97,7 – 100,0]*	
Centro-sul			
n (%)	0 (0)	37 (100)	37 (100)
IC 95%*	[0,0 – 9,5]*	[90,5 -100,0]*	
Serrana			
n (%)	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100)
IC 95%*	[0,2 – 41,3] *	[58,7 – 99,8] *	

\*Os intervalos de confiança a 95% foram obtidos através de teste exato para Proporção Binomial.

A identificação de um gato doméstico naturalmente infectado por *C. felis* representa o primeiro diagnóstico do parasito em gato doméstico confirmado por técnicas moleculares no Brasil e também na América do Sul. Métodos moleculares já foram empregados com sucesso para o diagnóstico em gatos residentes em áreas endêmicas nos EUA (MEINKOTH et al., 2000), em gatos domésticos na África do Sul (ALLSOPP et al., 1994) e na Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2003). Embora o DNA de *C. felis* já tenha sido detectado no país em felídeos selvagens mantidos em cativeiro em Volta Redonda-RJ (AMARAL, 2006; PEIXOTO et al., 2007), este é o primeiro diagnóstico molecular de *C. felis* em um gato doméstico no Brasil, cuja amostra é proveniente do mesmo Estado. O papel epidemiológico de gatos domésticos como hospedeiros de *C. felis* não foi estabelecido, apontando a necessidade da realização de estudos sobre o gênero, utilizando técnicas moleculares, a fim de que sejam identificadas as espécies-reservatório do protozoário, bem como os artópodes vetores do parasito em nosso país.

O animal positivo para este parasito veio ao óbito dias após o aparecimento de sinais clínicos (dados não publicados), demonstrando, desta forma, a importância do estudo desta doença em gatos domésticos, a qual está associada a altos índices de mortalidade (WAGNER, 1976; HOOVER et al., 1994; WALKER e COWELL, 1995; MEINKOTH, 2001b). Para que o tratamento necessário seja instituído em casos de citauxzoonose, é necessária a realização de um diagnóstico preciso. O resultado positivo para o agente obtido no presente estudo indica ser necessário incluir o

parasito *C. felis* como diagnóstico diferencial nos casos de hemoparasitoses em gatos domésticos.

Nenhuma infecção pelos gêneros *Babesia* spp e *Theileria* spp foi encontrada neste estudo. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos com Tabar et al. (2008), os quais, ao analisarem sangue proveniente de gatos saudáveis (n=48) ou doentes (n=52) de Barcelona (Espanha), não detectaram o DNA de *Babesia* spp. Por outro lado, em estudo conduzido por Criado-Fornelio et al. (2003) na Espanha e Portugal, foram detectados o DNA de *B. canis canis* e de *T. annae* em, respectivamente, 18,8% (3/16) e 12,5% (2/16) dos gatos avaliados. Em estudo subsequente, Criado-Fornelio et al. (2004) encontraram uma menor prevalência de piroplasmídeos utilizando-se do mesmo protocolo de PCR, sendo o DNA amplificado a partir do sangue de 5,0% (5/100) dos animais oriundos da Espanha. No Brasil, o único estudo molecular até então realizado focando a babesiose felina foi conduzido por Carneiro (2007), o qual encontrou cinco animais com inclusões intraeritrocitárias de piroplasmídeos. Destes, apenas um era PCR-positivo para *Babesia* spp (0,69% ou 1/144), posteriormente seqüenciada e identificada como *B. canis vogeli*.

No Brasil, Souza (2002) diagnosticou piroplasmídeos através da avaliação hematoscópica em 46,5% (47/101) dos gatos domésticos estudados. O maior número de animais positivos obtido naquele estudo pode ser explicado pela baixa sensibilidade do método de diagnóstico empregado, no qual precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly ou outros hemoparasitos, como, por exemplo, *M. haemofelis*, podem ser confundidos com piroplasmas, gerando resultados falso-positivos (SHAW et al., 2001).

Segundo Shaw et al. (2001), apesar dos hábitos de higiene e cuidados com a pelagem, as infestações por carrapatos são comuns em gatos que residem em áreas endêmicas. Contudo, gatos parecem apresentar menor predisposição às infestações por carrapatos e aos parasitos transmitidos por esses artrópodes, quando comparados aos cães. Isto explica a ausência de infecção por *Babesia* spp e a baixa ocorrência de animais infectados por *C. felis* encontradas no presente estudo.

O desmatamento e a invasão de áreas peri-silvícolas para construção de habitações têm como resultado a aproximação entre os reservatórios selvagens, artrópodes vetores, animais de companhia e o homem. Os gatos domésticos, em particular, têm o hábito de predação de pequenos mamíferos silvestres, que são

importantes reservatórios de algumas infecções transmitidas por vetores, que, por sua vez, adaptam-se ao ciclo peri-domiciliar envolvendo felinos (SHAW et al., 2001). Diante desta afirmação, conclui-se que a ocorrência da infecção depende de uma série de fatores, sendo difícil a comparação entre estudos conduzidos sob condições e países diferentes.

#### 4.2.2. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de hemoplasmas

A avaliação molecular das 207 amostras para *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' revelou a ocorrência de hemoplasmas em 29 gatos (14,0%; 29/207). Destes, 22 (75,9%; 22/29) eram oriundos da região Metropolitana, cinco (17,2%; 5/29) da Centro-Sul e dois (6,9%; 2/29) da Serrana. Os resultados PCR-positivos para hemoplasmas encontrados dentro de cada grupo, ou seja, nas regiões Metropolitana, Centro-sul e Serrana, foram similares estatisticamente (13,8%, 13,5% e 18,2%, respectivamente), o que sugere que a distribuição geográfica das infecções por hemoplasmas em gatos destas três regiões tende a ser homogênea.

Os resultados descritivos completos acerca da ocorrência de infecções pelos hemoplasmas testados e IC a 95% são apresentados na tabela 7.

**Tabela 7:** Ocorrência de hemoplasmas diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região	Hemoplasmas (PCR)		Total (%)
	Positivo	Negativo	
Metropolitana			
n (%)	22 (13,8)	137 (86,2)	159 (100)
IC 95%*	[8,9 – 20,2] *	[79,8 – 91,1] *	
Centro-sul			
n (%)	5 (13,5)	32 (86,5)	37 (100)
IC 95%*	[4,5 – 28,8] *	[71,2 – 95,5] *	
Serrana			
n (%)	2 (18,2)	9 (81,8)	11 (100)
IC 95%*	[2,3 – 51,8] *	[48,2 – 97,7] *	
Total n (%)	29 (14)	178 (86)	207 (100)

\*Os intervalos de confiança a 95% foram obtidos através de teste exato para Proporção Binomial.

A ocorrência total de hemoplasmas encontrada no presente estudo foi de 14,0%. Este valor está próximo àquele obtido por Macieira (2008) de 16,0% e por

Batista (2004) de 14,9%, trabalhos estes conduzidos, respectivamente, no Rio de Janeiro-RJ e em Botucatu-SP. Em estudos realizados em outros países, a prevalência de hemoplasmas varia demasiadamente. Porém, em acordo com os dados supracitados, a maioria dos autores encontrou ocorrências menores que 20,0% (GRINDEM et al., 1990; TASKER et al., 2003; INOKUMA et al., 2004; EBERHARDT et al., 2006; HACKETT et al., 2006; TASKER et al., 2006; WILLI et al., 2006a, 2006b; ISHAK et al., 2007; PETERS et al., 2008).

Não foram encontradas co-infecções por hemoplasmas neste estudo. A prevalência de co-infecção por estas duas espécies de hemoplasmas na literatura é baixa, com valores geralmente menores que 1% (TASKER et al., 2003, 2004; HACKETT et al., 2006; BAUER et al., 2008; PETERS et al., 2008) ou ausentes (INOKUMA et al., 2004; KEWISH et al., 2004; SYKES et al. 2007a). Estudos conduzidos no Brasil em que foi avaliada a ocorrência de co-infecções por estes hemoplasmas apontam para valores de 5,2% em Botucatu-SP (BATISTA, 2004), 7,9% em Curitiba-PR (BAUMMAN et al., 2006) e 2% em felinos provenientes da cidade do Rio de Janeiro-RJ (MACIEIRA, 2008).

Tanto a população de animais utilizados por Macieira (2008) quanto a metodologia empregada podem ser implicadas nos diferentes resultados obtidos por este autor em seu estudo. Os gatos investigados por Macieira (2008) eram animais com indicação para a realização de diagnóstico das retrovíroses FeLV e FIV: com sintomatologia clínica compatível ou naqueles em que se buscava excluir a possibilidade de infecção. Ademais, este autor utilizou-se de técnicas de Southern-Blot e hibridização de DNA, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da PCR convencional; estas técnicas não foram empregadas no presente estudo.

Segundo Shaw et al. (2001), os artrópodes mais comumente reconhecidos como vetores de doenças em felinos pertencem à família Pulicidae, na qual está classificada a pulga *Ctenocephalides felis*, o vetor mais provável na transmissão de hemoplasmas para felinos. Parasitos transmitidos por artrópodes são um problema emergente em medicina felina, constituindo-se, também, de uma preocupação para a saúde pública, uma vez que gatos com infecções subclínicas pode servir como reservatórios para parasitos zoonóticos. Tanto artrópodes quanto as infecções por estes transmitidas estão expandindo seu alcance zoogeográfico devido às mudanças climáticas e ao aumento da acessibilidade a novos habitats. As mudanças no manejo de terras e das águas também podem justificar um aumento



das populações de artrópodes e de sua maior distribuição geográfica (SHAW et al., 2001).

#### 4.2.2.1. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de *Mycoplasma haemofelis*

Através da análise molecular das 207 amostras, o DNA de *M. haemofelis* foi detectado em sete gatos (3,4% ou 7/207). Destes, cinco (71,4%; 5/7) eram oriundos da região Metropolitana, um (14,3%; 1/7) da região Centro-Sul e (14,3%; 1/7) da região Serrana. Os resultados PCR-positivos para *M. haemofelis* encontrados foram de 3,1% (5/159) na região Metropolitana, 2,7% (1/37) na Centro-sul e 9,1% (1/11) na Serrana, sem que fossem detectadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

Os resultados descritivos completos acerca da ocorrência de infecções por *M. haemofelis* e intervalos de confiança a 95% são apresentados abaixo, na tabela 8.

**Tabela 8:** Ocorrência de infecções por *Mycoplasma haemofelis* diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos ( $n=207$ ), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região	<i>Mycoplasma haemofelis</i> (PCR)		Total (%)
	Positivos	Negativos	
Metropolitana			
n (%)	5 (3,1)	154 (96,9)	159 (100)
IC 95%*	[1,0 – 7,2] *	[92,8 – 99,0] *	
Centro-sul			
n (%)	1 (2,7)	36 (97,3)	37 (100)
IC 95%*	[0,0 – 14,2] *	[85,8 – 99,9] *	
Serrana			
n (%)	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100)
IC 95%*	[0,2 – 4,1] *	[58,7 – 99,8] *	

\*Os intervalos de confiança a 95% foram obtidos através de teste exato para Proporção Binomial.

A ocorrência total de infecções por *M. haemofelis* (3,4%) neste trabalho foi próxima às frequências encontradas no Brasil por Macieira (2008) (4,0%); por Jensen et al. (2001) (4,5%), Hackett et al. (2006) (3,4%) e Ishak et al. (2007) (4,5%) nos EUA; por Tasker et al. (2004) e Willi et al. (2006a) (4,1%) na Austrália e por Bauer et al. (2008) (4,6%) na Alemanha. Estes dados permitem que se afirme que as infecções por *M. haemofelis* em gatos das regiões testadas neste estudo se comportaram da mesma forma que àquelas avaliadas no resto do mundo.

As maiores freqüências já descritas para *M. haemofelis* são de 20,0% em gatos da Espanha e Portugal (CRIADO-FORNELIO et al., 2003), 26,66% em animais do Canadá (KEWISH et al., 2004) e 37,8% em felinos provenientes do Paraná, Brasil (BAUMANN et al., 2006). Estes valores podem ser justificados diante do fato de que as populações de gatos testados nestes estudos eram animais anêmicos, e portanto suspeitos de infecção por hemoplasmas.

#### 4.2.2.2. Resultado da pesquisa molecular da ocorrência de 'Candidatus Mycoplasma haemominutum'

A ocorrência de infecções por 'Candidatus M. haemominutum' nos gatos testados foi de 22 animais positivos (10,6%; 22/207). Destes, 17 (77,3%; 17/22) eram oriundos da região Metropolitana, quatro (18,2%; 4/22) da região Centro-Sul e apenas um (4,5%; 1/22) da região Serrana. A porcentagem de animais PCR-positivos para 'Candidatus M. haemominutum' foi similar ( $p>0,05$ ) entre as regiões estudadas (10,7%, 10,8% e 9,1%) nas regiões Metropolitana, Centro-sul e Serrana, respectivamente).

Os resultados descritivos completos acerca da ocorrência de infecções por 'Candidatus M. haemominutum' e intervalos de confiança a 95% são apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Ocorrência de animais positivos para 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' diagnosticados por PCR e intervalos de confiança (IC) a 95% para os gatos (n=207), alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região	'Candidatus Mycoplasma haemominutum' (PCR)		Total (%)
	Positivos	Negativos	
Metropolitana			
n (%)	17 (10,7)	142 (89,3)	159 (100)
IC 95%*	[6,4 – 16,6] *	[83,4 – 93,6] *	
Centro-sul			
n (%)	4 (10,8)	33 (89,2)	37 (100)
IC 95%*	[3,0 – 25,4] *	[74,6 – 97,0] *	
Serrana			
n (%)	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100)
IC 95%*	[0,2 – 4,1] *	[58,7 – 99,8] *	

\*Os intervalos de confiança a 95% foram obtidos através de teste exato para Proporção Binomial.

A ocorrência total de infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' (10,6%) encontrada no presente trabalho foi próxima àquela verificada por alguns autores: Baumann et al. (2006) e Macieira (2008) no Brasil, de, respectivamente, 10,8% e 10,0%; Criado-Fornelio et al. (2003) na Espanha, de 10%; Jensen et al. (2001), Luria et al. (2004) e Ishak et al. (2007) nos EUA, de, respectivamente, 12,7%, 12,2% e 8,0%; Peters et al. (2008) no Reino Unido, de 9,7% e Kewish et al. (2004) no Canadá, de 11,7%.

As maiores frequências relatadas na literatura para '*Candidatus M. haemominutum*' foram de 22,5% em gatos da Alemanha (BAUER et al., 2008) e 23,1% em felinos da Austrália (TASKER et al., 2004). Em um estudo realizado nos EUA envolvendo apenas gatos infestados por pulgas, a frequência obtida foi de 21,7% (LAPPIN et al., 2006).

#### **4.3. Comparação entre as metodologias de diagnóstico**

A comparação entre os métodos de diagnóstico revelou uma maior sensibilidade do método molecular (PCR), com diferença estatística significativa ( $p=0,0004$ ), confirmando a baixa sensibilidade do método de avaliação por microscopia ótica de esfregaço sanguíneo corado (WAGNER et al., 1976, 1980; GAUNT, 2000; SHAW et al., 2001; WESTFALL et al., 2001; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; HARVEY, 2006).

#### **4.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos e proteínas plasmáticas totais**

Devido à existência de grandes diferenças geográficas e populacionais, bem como nas características dos animais entre as três regiões avaliadas, não foram realizadas comparações entre os parâmetros hematológicos e de proteínas plasmáticas totais para os grupos. A distribuição dos parâmetros obtidos de hemograma e proteínas plasmáticas totais nos 207 gatos encontra-se alocada, em função da região, na tabela 10:

**Tabela 10:** Distribuição dos parâmetros laboratoriais dos 207 gatos, alocados de acordo com a região: Metropolitana, Centro-sul e Serrana, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Geral (n=207)	VG (%)	34,9	7,31	11,0	51,0
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,28	1,6	2,14	14,4
	Hb (g/dL)	11,5	2,4	3,4	16,9
	VGM (fL)	48,4	3,4	40,0	71,0
	CHGM (%)	32,9	1,45	25,0	38,0
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	13596	7199	400	57800
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	348000	179000	47000	924000
	PPT (g/dL)	7,6	0,99	4,6	12,0
Metropolitana (n=159)	VG (%)	34,8	7,23	17,0	48,0
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,32	1,60	3,17	14,4
	Hb (g/dL)	11,42	2,37	5,80	15,7
	VGM (fL)	47,95	3,28	40,0	71,0
	CHGM (%)	32,9	1,52	25,0	38,0
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	14033	7693	1170	57800
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	388000	180000	47000	924000
	PPT (g/dL)	7,41	0,96	4,6	12,0
Centro-sul (n=37)	VG (%)	37,0	5,0	22,0	46,0
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,45	1,11	4,09	9,8
	Hb (g/dL)	12,4	1,75	6,7	15,8
	VGM (fL)	50,0	2,60	45,0	56,0
	CHGM (%)	33,4	0,92	31,0	35,0
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	11914	3407	6500	20200
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	228000	79000	93000	395000
	PPT (g/dL)	8,4	0,63	7,0	10,2
Serrana (n=11)	VG (%)	29,7	11,8	11,0	51,0
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,23	2,8	2,14	10,9
	Hb (g/dL)	9,8	3,9	3,40	16,9
	VGM (fL)	49,1	5,57	40,0	60,0
	CHGM (%)	33,0	1,8	30,0	36,0
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	12955	8758	400	30500
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	171000	111000	48000	344000
	PPT (g/dL)	5,6	-	5,6	5,6

VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global; PPT: proteínas plasmáticas totais.

#### 4.4.1. Comparação entre parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais dos animais positivos e negativos para *Cytauxzoon felis* por meio de diagnóstico molecular

A comparação entre os valores hematológicos obtidos do animal positivo e dos animais negativos para *C. felis* não revelou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Embora não estivesse anêmico, o animal positivo para este agente estava co-infectado com '*Candidatus M. haemominutum*'. Esta ausência de diferença estatística poderia ser justificada pelo fato de haver apenas uma amostra positiva para *C. felis*.

A citauxzoonose é considerada uma doença fatal para gatos domésticos (WAGNER, 1976; KIER et al., 1982b; GLENN et al., 1984; FRANKS et al., 1988; HOOVER et al., 1994; MEINKOTH, 2001b). A ausência de alterações nos parâmetros hematológicos observada no animal PCR-positivo deste estudo é semelhante ao que foi encontrado por Haber et al. (2007), os quais relataram três animais PCR-positivos para *C. felis* que não apresentavam alterações laboratoriais ou sinais clínicos da doença.

O animal positivo para *C. felis* no presente estudo veio ao óbito dias após a coleta da amostra de sangue e o aparecimento de sinais clínicos (dados não publicados). É possível que seu curso rápido tenha impedido, tanto neste trabalho quanto no conduzido por Haber et al. (2007), o surgimento de alterações hematológicas. A única alteração hematológica presente no hemograma deste gato foi a trombocitopenia. Não foram observadas alterações típicas da citauxzoonose felina, como anemia normocítica normocrômica e leucopenia, acompanhada ou não por DNNE (KOCAN et al., 1985; HOOVER et al., 1994; GARNER et al., 1996; CRYSTAL, 1998; ROTSTEIN et al., 1999). Este animal apresentou, à hematoscopia, presença de monócitos ativados, a qual se justifica pelo aumento da atividade fagocitária destes nos casos de hemoparasitoses (ALMOSNY, 2002).

Devido ao fato da amostra positiva para *C. felis* pertencer ao grupo da região Serrana (Areal-RJ), os parâmetros hematológicos de animais positivos e negativos por PCR neste grupo estão alocados na tabela 11.

**Tabela 11:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para *Cytauxzoon felis* no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Serrana	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivos (n=1)	VG (%)	28,0	-	28,0	28,0	0,751
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,58	-	6,58	6,58	0,752
	Hb (g/dL)	9,2	-	9,2	9,2	0,751
	VGM (fL)	43,0	-	43,0	43,0	0,204
	CHGM (%)	33,0	-	33,0	33,0	0,871
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	14700	-	14700	14700	0,874
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	81000	-	81000	81000	0,343
Negativos (n=10)	VG (%)	29,9	12,5	11,0	51,0	Grupo de referência
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,2	2,93	2,14	10,9	
	Hb (g/dL)	9,87	4,12	3,4	16,9	
	VGM (fL)	49,7	5,48	40,0	60,0	
	CHGM (%)	33,0	1,88	30,0	35,0	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	12780	9211,9	400	20700	
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	575400	112789	48000	344000	

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Desvio padrão não obtido devido à presença de apenas um animal no grupo.

VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global; PPT: proteínas plasmáticas totais.

#### 4.4.2. Comparação entre parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais dos animais positivos e negativos para *Mycoplasma haemofelis* por meio de diagnóstico molecular

Gatos PCR-positivos para *M. haemofelis* obtiveram valores significativamente maiores de CHGM ( $p=0,035$ ) quando comparados aos animais negativos. Isto pode ser explicado pela hemólise extravascular que pode ocorrer em animais infectados, devido à produção de anticorpos anti-eritrocíticos e anti-hemoplasmas (TASKER e LAPPIN, 2006).

Muitos autores consideram que as infecções por *M. haemofelis* geralmente produzem anemia e sinais clínicos da doença (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; MESSICK, 2004). No entanto, não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos outros parâmetros avaliados. De acordo com dados presentes na literatura, os parâmetros hematológicos de animais infectados como hemoplasmas podem apresentar grande variação, sendo de pouco auxílio ao diagnóstico (HARVEY e GASKIN, 1977; FOLEY et al., 1998).

Estes achados sugerem que os animais positivos são portadores assintomáticos, apresentando infecções crônicas, uma vez que animais infectados

por hemoplasmas podem manter parasitemias baixas e persistentes, mesmo após o tratamento (HARVEY e GASKIN, 1978; BERENT et al., 1998; MESSICK et al., 1998). A distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo proveniente da região Metropolitana encontra-se na tabela 12.

**Tabela 12:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Metropolitana (n=159), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Metropolitana	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivos (n=5)	VG (%)	31,8	11,3	17,0	45,0	0,584
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,88	2,5	3,99	9,42	0,737
	Hb (g/dL)	10,82	3,8	6,1	15,6	0,711
	VGM (fL)	46,4	4,1	41	50	0,622
	CHGM (%)	34,2	1,3	33	36	0,035
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	17740	9507,5	9500	29500	0,338
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	497400	202264	150000	640000	0,170
	PPT (g/dL)	7,68	0,8	6,8	8,8	0,464
Negativos (n=154)	VG (%)	34,87	7,09	17	48	Grupo de referência
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,33	1,57	3,17	14,4	
	Hb (g/dL)	11,44	2,33	5,8	15,7	
	VGM (fL)	48,0	3,26	40	71	
	CHGM (%)	32,8	1,5	25	38	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	13912	7635,2	1170	57800	
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	385000	178670	47000	924000	
	PPT (g/dL)	7,4	0,97	4,6	12,0	

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global; PPT: proteínas plasmáticas totais.

A comparação entre os valores hematológicos de gatos PCR-positivos e negativos para *M. haemofelis* no grupo de gatos da região Centro-sul revelou não haver diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os valores dos parâmetros hematológicos de animais positivos e negativos, como pode ser observado na Tabela 13.

**Tabela 13:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Centro-sul (n=37), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Centro-sul	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivo (n=1)	VG (%)	36,0	-	36,0	36,0	0,480
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,45	-	7,45	7,45	0,673
	Hb (g/dL)	11,7	-	11,7	11,7	0,348
	VGM (fL)	49,0	-	49,0	49,0	0,538
	CHGM (%)	32,0	-	32,0	32,0	0,143
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	17100	-	17100	17100	0,160
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	336000	-	336000	336000	0,160
	PPT (g/dL)	9,6	-	9,6	9,6	0,130
Negativos (n=36)	VG (%)	37,1	5,07	22,0	46,0	Grupo de referência
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,45	1,12	4,09	9,78	
	Hb (g/dL)	12,42	1,77	6,70	15,80	
	VGM (fL)	50,0	2,66	45,0	56,0	
	CHGM (%)	33,4	0,91	31,0	35,0	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	11769	3338,7	6500	20200	
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	225000	77468	93000	395000	
	PPT (g/dL)	8,37	0,61	7,00	10,20	

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Desvio padrão não obtido devido à presença de apenas um animal no grupo.

VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global; PPT: proteínas plasmáticas totais.

Embora somente um animal tenha sido diagnosticado como positivo, não obstante, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os valores hematológicos de animais positivos e negativos pelo PCR para *M. haemofelis* na região Serrana. O animal positivo neste grupo apresentava uma anemia normocítica normocrômica, alteração hematológica compatível com a manifestação clínica da doença por este agente (JAIN, 1993b; HARVEY, 2006). Estes dados encontram-se distribuídos na Tabela 14.



**Tabela 14:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para *Mycoplasma haemofelis*, no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Serrana	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivo (n=1)	VG (%)	19,0	-	19,0	19,0	0,266
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	3,49	-	3,49	3,49	0,206
	Hb (g/dL)	6,9	-	6,9	6,9	0,342
	VGM (fL)	54,0	-	54,0	54,0	0,204
	CHGM (%)	36,0	-	36,0	36,0	0,104
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	30500	-	30500	30500	0,113
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	610000	-	610000	610000	0,527
Negativos (n=10)	VG (%)	30,8	11,91	11,0	51,0	Grupo de referência
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,5	2,77	2,14	10,91	
	Hb (g/dL)	10,1	3,99	3,40	16,9	
	VGM (fL)	48,6	5,62	40,0	60,0	
	CHGM (%)	32,7	1,56	30,0	35,0	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	11200	6899,7	400	20700	
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	164100	114,46	48000	344000	

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Desvio padrão não obtido devido à presença de apenas um animal no grupo.

VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global.

4.4.3. Comparação entre parâmetros de hemograma e proteínas plasmáticas totais nos animais positivos e negativos para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' por meio de diagnóstico molecular

Os valores hematológicos de gatos PCR-positivos e negativos para '*Candidatus M. haemominutum*' foram comparados, de acordo com sua região geográfica de origem, sem apontar qualquer diferença estatística ( $p > 0,05$ ). O animal positivo proveniente da região Serrana para este agente estava co-infectado com *C. felis*. Estes dados estão compilados nas tabelas a seguir (Tabelas 15, 16 e 17):

**Tabela 15:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Metropolitana (n=159), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Metropolitana	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivos (n=17)	VG (%)	33,9	5,33	20	43	0,487
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,0	1,17	4,15	8,7	0,371
	Hb (g/dL)	11,11	1,92	6,4	14,2	0,481
	VGM (fL)	48,35	1,93	45	52	0,593
	CHGM (%)	32,6	1,50	31	37	0,243
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	15865	11935,7	7200	57800	0,808
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	379411	180867	182000	894000	0,826
Negativos (n=142)	PPT (g/dL)	7,3	0,96	4,6	8,2	0,746
	VG (%)	34,9	7,42	17,0	48	
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,35	1,6	3,17	14,4	
	Hb (g/dL)	11,45	2,42	5,8	15,7	Grupo de referência
	VGM (fL)	47,9	3,41	40	71	
	CHGM (%)	32,9	1,53	25	38	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	13813	7050,3	1170	42700	
Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	389373	180325	47000	924000		
PPT (g/dL)	7,4	0,96	5,0	12,0		

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.  
VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global.

**Tabela 16:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Centro-sul (n=37), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Centro-sul	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivos (n=4)	VG (%)	36,75	4,50	31,0	42,0	0,787
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,41	1,02	6,22	8,68	0,696
	Hb (g/dL)	12,3	1,52	10,3	14,0	0,807
	VGM (fL)	49,75	0,96	49,0	51,0	0,805
	CHGM (%)	33,25	0,50	33,0	34,0	0,527
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	13450	4926,5	9100	20200	0,557
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	189000	87510	106000	189000	0,434
Negativos (n=33)	PPT (g/dL)	8,05	0,82	7,00	8,0	0,360
	VG (%)	37,1	5,13	22,0	46,0	
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,46	1,14	4,1	9,78	
	Hb (g/dL)	12,42	1,8	6,7	15,8	Grupo de referência
	VGM (fL)	50,0	2,77	45,0	56,0	
	CHGM (%)	33,4	0,97	31,0	35,0	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	11727	3232,6	6500	19300	
Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	232720	77500	93000	395000		
PPT (g/dL)	8,45	0,61	7,6	10,2		

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.  
VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global.

**Tabela 17:** Distribuição dos parâmetros hematológicos do grupo de gatos provenientes da região Serrana (n=11), testados por PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', no período de setembro a dezembro de 2007.

Região Serrana	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivo (n=1)	VG (%)	28,0	-	28,0	28,0	0,751
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,58	-	6,58	6,58	0,752
	Hb (g/dL)	9,2	-	9,2	9,2	0,751
	VGM (fL)	43,0	-	43,0	43,0	0,204
	CHGM (%)	33,0	-	33,0	33,0	0,871
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	14700	-	14700	14700	0,874
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	81000	-	81000	81000	0,343
	PPT (g/dL)	-	-	-	-	-
Negativos (n=10)	VG (%)	29,9	12,5	11,0	51,0	
	Hematimetria ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6,2	2,93	2,14	10,9	
	Hb (g/dL)	9,87	4,12	3,4	16,9	Grupo de referência
	VGM (fL)	49,7	5,48	40,0	60,0	
	CHGM (%)	33,0	1,88	30,0	36,0	
	LG ( $/\text{mm}^3$ )	12780	9211,9	400	30500	
	Plaquetometria ( $/\text{mm}^3$ )	575400	112789	48000	344000	
	PPT (g/dL)	-	-	-	-	

\*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Desvio padrão não obtido devido à presença de apenas um animal no grupo.

VG: volume globular; Hb: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LG: leucometria global.

A ausência de alterações significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros hematológicos de gatos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' está de acordo os relatos de que a infecção por este organismo geralmente não causa sinais clínicos (FOLEY et al., 1998; LORIMIER e MESSICK, 2004).

Embora estivessem dentro dos valores de referência, os valores médios do hematócrito de animais PCR-positivos de todos os grupos foram numericamente mais baixos. Este achado corrobora os dados obtidos pelos autores Foley et al. (1998), Lorimier e Messick (2004) e Tasker et al. (2004), os quais observaram que gatos infectados com '*Candidatus M. haemominutum*' apresentaram valores de VG inferiores àqueles de animais não infectados.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem que se formulem as seguintes conclusões:

1. A ocorrência de infecção por hemoparasitos em gatos domésticos foi baixa e não diferiu significativamente nas três diferentes regiões estudadas do Estado do Rio de Janeiro. Dentre os agentes investigados, os hemoplasmas, em especial '*Candidatus M. haemominutum*', foram mais comumente detectados;
2. A ocorrência de *Babesia* spp e *Theileria* spp é nula ou extremamente baixa nas regiões estudadas, uma vez que não foram observados animais positivos para estes hemoparasitos dentre a população investigada;
3. A caracterização de *C. felis* infectando gatos, confirmada através de testes moleculares, representa o primeiro relato de infecção natural por *Cytauxzoon* sp. em um gato doméstico no país;
4. Gatos domésticos podem apresentar co-infecções naturais por *C. felis* e '*Candidatus M. haemominutum*';
5. O diagnóstico molecular de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' foi significativamente mais sensível que o diagnóstico direto por microscopia ótica;
6. Gatos com diagnóstico molecular confirmado para *C. felis*, *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' não apresentaram alterações no perfil

hematológico, caracterizando-se como prováveis reservatórios destes hemoparasitos.

## 6. OBRAS CITADAS

ALLEMAN, A. R.; PATE, M. G.; HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M.; BARBET, A. F. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1474-1479, 1999.

ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WALL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, v. 108, p. 147-152, 1994.

ALMOSNY, N. R. P. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária Editora. 2002. 135p.

ALMOSNY, N. R. P.; BOMPET, A. P. Diagnóstico laboratorial de babesiose felina em dois gatos atendidos na Policlínica da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. In: *Seminário de Iniciação Científica*. Niterói: UFF, 1999.

AMARAL, A. S. Análises genotípica e filogenética do gene 18S RNAr de isolados brasileiros de *Cytauxzoon felis* (Apicomplexa: Theileriidae). Seropédica: UFRRJ, 2006. 53 f. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 99-105, 2004.

BATISTA, T. N. Frequência de infecção do *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' em gatos (*Felis catus*). Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), 2004. 44 f. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária)

BAUER, N.; BALZER, H. J.; THÜRE, S.; MORITZ, A. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2008 Feb 12, DOI: 10.1016/j.jfms.2007.12.004

BAUMANN, A.; GUIMARAES, A. M. S.; SILVA, C. C.; YAMAGUTI, M.; KOZEMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. In: Abstracts of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 41st. Annual Meeting, 2006, Tucson. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 35, p. 370, 2006.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 10, p. 1215-1220, 1998.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K.; CUSICK, P. K. Specific in situ hybridization of *Haemobartonella felis* with a DNA probe and tyramide signal amplification. *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 1, p. 47-53, 2000.

BIRKENHEUER, A. J.; MARR, H.; ALLEMAN, A. R.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 144-149. 2006a.

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

BLOUIN, E. F., KOCAN, A. A., GLENN, B. L., KOCAN, K. M. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentos variabilis* (Say). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 20, n. 3, p. 241-242. 1984.

BLOUIN, E. F., KOCAN, A. A., KOCAN, K. M., HAIR, J. Evidence of a limited schizogonous cycle of *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 23, n. 3, p. 499-501. 1987.

BOBADE, P. A.; NASH, A. S. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. *Veterinary Parasitology*, v. 26, n.1-2, p. 169-172, 1987.

BONDY JR, P. J.; COHN, L. A.; TYLER, J. W.; MARSH, A. E. Polymerase Chain Reaction detection of *Cytauxzoon felis* from field-collected ticks and sequence analysis of the small subunit and internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal RNA gene. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 458-461, 2005.

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. *Veterinary Parasitology* v. 144, p. 33-38, 2007.

BOWMAN, D. D.; HENDRIX, C. M.; LINDSAY, D. S.; BARR, S. C. The Piroplasms: *Cytauxzoon* and *Babesia*. In BOWMAN, D. D.; HENDRIX, C. M.; LINDSAY, D. S.; BARR, S. C. (Eds.). In: *Feline Clinical Parasitology*, 1a ed. Oxford: Iowa State University Press (Blackwell Science Company), 2002, p. 42-49.

BROCKLESBY, D. W. *Cytauxzoon taurotragi*, Martin and Brocklesby, 1960, a piroplasm of the Eland (*Taurotragus oryx pattersonianus* Lydekker, 1906). *Research in Veterinary Science*, v. 3, p. 334-344. 1962.

BÜCHELER, J.; GIGER, U. Cold agglutinins in feline haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, n. 5, p. 740, 1991.

BUTT, M. T.; BOWMAN, D.; BARR, M. C.; ROELKE, M. E. Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from a Florida panther (*Felis concolor coryi*) to a domestic cat. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 27, n. 2, p. 342-347. 1991.

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

CLARK, R. *Eperythrozoon felis* (Sp. Nov.) in a cat. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, v. 13, p. 15-16, 1942.

COLES, H. *Veterinary Clinical Pathology*. 4ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. 486 p.

COOPER, S. K.; BERENT, L. M.; MESSICK, J. B. Competitive, quantitative PCR analysis of *Haemobartonella felis* in the blood of experimentally infected cats. *Journal of Microbiological Methods*, v. 34, p. 235-244, 1999.

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

COWELL, R. L.; PANCIERA, R. J.; FOX, J. C.; TYLER, R. D. Feline cytauxzoonosis. *Compendium of Small Animal Medicine*, v. 10, p. 731-735. 1988b.

CRIADO-FORNELIO, A.; GONZALEZ-DEL-RIO, M. A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. The "expanding universe" of piroplasms. *Veterinary Parasitology*, v. 119, p. 337-345. 2004.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, v. 93, p. 307-317. 2003.

CRYSTAL, M. A. Citauxzoonose. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M. A.; FOOSHEE, S. K.; TILLEY, L. P. *O Paciente Felino - Tópicos Essenciais de Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo: Manole. 2004. p. 197-200.



DEAN, R.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *M. haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *In: Proceedings of the BSAVA Congress, Gloucester-UK*, p. 554. 2005.

DEMAREE, R. E., NESSMITH W. B.. Ultrastructure of *Haemobartonella felis* from a naturally infected cat. *American Journal of Veterinary Research*, v. 33, p. 1303-1308. 1972.

EBERHARDT, J. M.; NEAL, K.; SHACKELFORD, T.; LAPPIN, M. R. Prevalence of selected infectious disease agents in cats from Arizona. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 8, p.164-168, 2006.

FLINT, J. C.; MCKELVIE, D. H. Feline Infectious Anemia - Diagnosis and Treatment. *In: Proceedings of the AVMA 92 nd. Annual Meeting*, p. 240-242, 1955.

FLINT, J. C.; MOSS, L. C. Infectious Anemia in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 122, p. 45-48, 1953.

FLINT, J. C.; ROEPKE, M. H.; JENSEN, R. Feline infectious anemia. I. Clinical aspects. *American Journal of Veterinary Research*, v. 19, n. 70, p. 164-168, 1958.

FLINT, J. C.; ROEPKE, M. H.; JENSEN, R. Feline infections anemia. II. Experimental cases. *American Journal of Veterinary Research*, v. 20, p. 33-40, 1959.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 815-817, 2001.

FRANKS, P. T.; HARVEY, J. W.; SHIELDS, R. P.; LAWMAN, M. J. P. Hematological findings in experimental Feline Cytauxzoonosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 24, p. 395-401. 1988.

FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' Infection in Domestic Cats in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, 2007.

FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C. Studies on feline babesiosis 2. Clinical observations. *Journal of the South African Veterinary Association*. v. 51, n. 3, p. 143-146, 1980.

FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C.; VAN DEN BERG, A. Studies on feline babesiosis 3. Haematological findings. *Journal of the South African Veterinary Association*, 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. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 52, n. 1, p. 5-14, 1981.

GARNER, M. M.; LUNG, N. P.; CITINO, S.; GREINER, E. C.; HARVEY, J. W.; HOMER, B. L. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared White Tiger (*Panthera tigris*). *Veterinary Pathology*, v. 33, p. 82-86. 1996.

GARY, A. T.; RICHMOND, H. L.; TASKER, S.; HACKETT, T. B.; LAPPIN, M. R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in blood of cats used for transfusions. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 8, p. 321-326, 2006.

GAUNT, S. D. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B. F.; ZIKL, J. G.; JAIN, N. C. *Shalm's Veterinary Hematology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 154-162.

GAZÊTA, G. S.; MONTEIRO, A.; ABOUD-DUTRA, A. E. Babesiose felina no Brasil: uma nova espécie? In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004, Ouro Preto-MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13. p. 228-228, 2004.

GLENN, B. L.; ROLLEY, R. E.; KOCAN, A. A. Cytauxzoon-like piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 181, n. 11, p. 1251-1253. 1982.

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

GLENN, B. L.; STAIR, E. L. Cytauxzoonosis in domestic cats: report of two cases in Oklahoma, with a review and discussion of the disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 184, n. 7, p. 822-825. 1984.

GREENE, C. E.; LATIMER, K.; HOPPER, E.; SHOEFFLER, G.; LOWER, K.; CULLENS, F. Administration of diminazene aceturate or imidocarb dipropionate for treatment of cytauxzoonosis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 215, n. 4, p. 497-500, 1999.

GREENE, C. E.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. Cytauxzoonosis. In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006, cap. 76, p. 716-722.

GRINDEM, C. B.; CORBETT, W. T.; TOMKINS, M. T. Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 1, p. 96-99, 1990.

GUIMARAES, A. M. S.; JAVOROUSKI, M. B.; LACERDA, O.; BALBINOTTI, B.; QUEIROZ, L. G. P. B.; TIMENETSKY, J.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Molecular detection of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a lion (*Panthera leo*) from a Brazilian zoological garden. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, n. 3, p. 195-196, 2007.

HABER, M. D.; TUCKER, M. D.; MARR, H. S.; LEVY, J. K.; BURGESS, J.; LAPPIN, M. R.; BIRKENHEUER, A. J. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. *Veterinary Parasitology*, v. 146, p. 316-320. 2007.

HACKETT, T. B.; JENSEN, W. A.; LEHMAN, T. L.; HOHENHAUS, A. E.; CRAWFORD, P. C.; GIGER, U.; LAPPIN, M. R. Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum,' *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 229, p. 700-705, 2006.

HARBUTT, P. R. A Clinical appraisal of feline infectious anaemia and its transmission under natural conditions. *Australian Veterinary Journal*, v. 39, p. 401-404. 1963.

HARVEY, J. W. Hemotrophic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006, cap. 31, p. 252-260.

HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M. Experimental feline haemobartonellosis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 13, n. 1 p. 28-38. 1977.

HAUCK, W. N. Cytauxzoonosis in a native Louisiana cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n. 12, p. 1472-1474, 1982.

HAYES, H. M.; PRIESTER, W. A. Feline infectious anaemia. Risk by age, sex and breed; prior disease; seasonal occurrence; mortality. *The Journal of Small Animal Practice*, v. 14, n. 12, p. 797-804, 1973.

HOLZWORTH, J. Anemia in the cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 128, n. 10, p. 471-488, 1956.

HOOVER, J. P.; WALKER, D. B.; HEDGES, J. D. Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 205, n. 3, p. 455-460. 1994.

HUBER, W. G. Tetraciclinas. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 50, p. 655-661.

INOKUMA, H.; TAROURA, S.; OKUDA, M.; HISASUE, M.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Molecular survey of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection in cats in Yamaguchi and surrounding areas. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 66, n. 8, p. 17-20. 2004.

- ISHAK, A. M.; RADECKI, S.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 9, p.1-7, 2007.
- JACOBSON, L. S.; SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G. A survey of feline babesiosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. v. 71, n. 4, p. 222-228, 2000.
- JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993a. p. 20.
- JAIN, N. C. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993b. p. 177-192.
- JAKOB, W.; WESEMEIER, H. H. A fatal infection in a Bengal Tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *Journal of Comparative Pathology*, v. 114, p. 439-444. 1996.
- JENSEN, W. A.; LAPPIN, M. R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W. J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 4, p. 604-608, 2001.
- KETZ-RILEY, C. J.; REICHARD, M. V.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HOOVER, J. P.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Palla's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 39, n. 2, p. 424-430. 2003.
- KEWISH, K. E.; APPELYARD, G. D.; MYERS, S. L.; KIDNEY, B. A.; JACKSON, M. L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 45, n. 9, p.749-752, 2004.
- KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; KINDEN, D. A. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 97, p. 415-432. 1987.
- KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; MOREHOUSE, L. G. Experimental transmission of *Cytauxzoon felis* from bobcats (*Lynx rufus*) to domestic cats (*Felis domesticus*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 1, p. 97-101. 1982a.
- KIER, A. B.; WIGHTMAN, S. R.; WAGNER, J. E. Interspecies transmission of *Cytauxzoon felis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 1, p. 102-105, 1982b.
- KOCAN, A. A.; BLOUIN, E. F.; GLENN, B. L. Hematologic and serum chemical values for free-ranging bobcats, *Felis rufus* (Schreber), with reference to animals with natural infections of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 21, n. 2, p.190-192. 1985.

KOCAN, A. A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; MUKOLWE, S. W. A redescription of schizogony of *Cytauxzoon felis* in the domestic cat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 653, p. 161-167. 1992.

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 8, n. 2, p. 85-90, 2006.

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, v. 75, n. 2, p. 94-99, 2004.

LÓPEZ-REBOLLAR, L. M.; PENZHORN, B. L.; WAAL, D. T.; LEWIS, B. D. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 35, n. 1, p. 82-85, 1999.

LORIMIER, L. P.; MESSICK, J. B. Anemia associated with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a feline leukemia virus-negative cat with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, n. 5, p. 423-427, 2004.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 6, n.5, p.287-296, 2004.

MACIEIRA, D. B. Hemoplasmas em gatos domésticos: Prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus das imunodeficiência e/ou leucemia felinas. Seropédica: UFRRJ, 2008. 105 f. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

MASSARD, C.L.; FREIRE, N. M. S.; FLAUSINO, W. Sobre o encontro de *Haemobartonella felis* Flint & McKelvin, 1955 (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) em *Felis catus domesticus* L. no continente Sul-americano, Brasil. *Anais do XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária* (1976), p.161, 1978.

MCCULLY, R. M., KEEP, M. E., BASSON, P. A. Cytauxzoonosis in a Giraffe [*Giraffa camelopardalis* (Linnaeus, 1758)] in Zuzuland. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 37, n. 1, p. 7-10. 1970.

McDOUGALD, L. R.; ROBERSON, E. L. Drogas antiprotozoários. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 57, p. 768-782.

MCGROTTY, Y. L.; KNOTTENBELT, C. M. Oesophageal stricture in a cat due to oral administration of tetracyclines. *The Journal of Small Animal Practice*, v. 43, p. 221-223, 2002.

MEHLHORN, H; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*, v. 23, p. 37-103. 1984.

MEIER, H. T.; MOORE, L. E.; Feline cytauxzoonosis: A case report and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 36, p. 493-496. 2000.

MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MURPHY, G.; FOX, J. C.; WOODS, J.P. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997–1998). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, p. 521–525. 2000.

MEINKOTH, J. H. Update on Cytauxzoonosis. IN: AUGUST, J. R. *Consultations in Feline Internal Medicine*. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001a. p. 436-438.

MEINKOTH, J. H. Cytauxzoon felis. In: LAPPIN, M. R., *Feline Internal Medicine Secrets*, 2 ed. Philadelphia: Hanley & Belfus INC., 2001b. p. 383-387.

MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. A. Feline Cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 35, p. 89–101, 2005.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C. F.; BRANCO, 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. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 5, p. 269-274. 2004.

MESSICK, J. B.; BERENT, L. M.; COOPER, S. K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

MESSICK, J. B.; WALKER, P. G.; RAPHAEL, W.; BERENT, L.; SHI, X. 'Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v. 52, p. 693-698, 2002.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 33, n. 1, 2004.

MEYER, D.; HARVEY, J. W. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp., 1998, 373 p.

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

MORAIS, H. A.; GUIMARAES, A. M.; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in three cats from Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 9, n.6, p. 518-520, 2007.

NASH, A. S.; BOBADE, P. A. *Haemobartonella felis* infection in cats from the Glasgow area. *The Veterinary Record*, v. 119, n.15, p.373-375, 1986.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 683, 2002.

NEITZ, W. O. Theileriosis, Gonderioses and Cytauxzoonoses: a review. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 27, n. 3, 1957.

NEITZ, W. O.; THOMAS, A. D. *Cytauxzoon sylvicaprae* gen. nov., esp. nov., a Protozoon Responsible for a Hithero Undescribed Disease in the Duiker [*Sylvicapra grimmia* (Linné)]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, v. 23, n. 1-2, p. 63-76. 1948.

NIETFELD, J. C.; POLLOCK, C. Fatal Cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 38, n. 3, p. 607-610. 2002.

NORSWORTHY, G. D. Hemobartonelose. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M. A.; FOOSHEE, S. K.; TILLEY, L. P. *O Paciente Felino - Tópicos Essenciais de Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo: Manole. 2004. p. 299-302.

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*. 2002. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, p. 57-67.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 1, p. 1-6. 1994.

PASSOS, L. M.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

- PEIXOTO, P. V.; SORAES, C. O.; SANTIAGO, C. D.; BARROS, S. S.; BARROS, C. L. S.; CUNHA, B. M. Citauxzoonose fatal em leões (*Panthera leo*) no Brasil. In: XXVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1999, Campo Grande, MS. *Anais eletrônicos...* Campo Grande, MS: COMBRAVET, 1999. CD-ROM.
- PEIXOTO, P.V.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T.N.; BARROS, S. S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 145, p. 383-387, 2007.
- PENZHORN, B. L.; KJEMTRUP, A. M.; LÓPEZ-REBOLLAR, L. M.; CONRAD, P. A. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and the relations to other piroplasms. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 681-685, 2001.
- PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis in South Africa: a review. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1026, p. 183-186, 2004.
- PENZHORN, B. L.; STYLIANIDES, E.; COETZEE, M. A.; VILJOEN, J. M.; LEWIS, B. D. A focus of feline babesiosis at Kaapschehoop on the Mpumalanga escarpment. *Journal of the South African Veterinary Association*. v. 70, p. 60. 1999.
- PENZHORN, B. L.; LEWIS, B. D.; LÓPEZ-REBOLLAR, L. M.; SWAN, G. E. Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats. *Journal of the South African Veterinary Association*. v. 71, p. 53-57, 2000.
- PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Veterinary Microbiology*, v.126, p. 142-150, 2008.
- PICHOTANO, M. E.; VARZIM, F. L. S. B.; SILVA, M. A. M. L. E.; CASTRO, K. F. Citauxzoonose: relato de caso. In: *XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino Americano de Rickettsioses*, 2004, Ouro Preto. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13. p. 247-247. 2004.
- POTGIETER, F. T. Chemotherapy of *Babesia felis* infection: efficacy of certain drugs. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 52, p. 289-293, 1981.
- REICHARD, M. V.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; MEINKOTH, J. H.; HOOVER, J. P.; KOCAN, A. A. A new species of *Cytauxzoon* from Palla's cats caught in Mongolia and comments on systematics and taxonomy of piroplasmids. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 2, p. 420-426. 2005.
- REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 19, n. 2, p. 68-74. 2004.
- REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 410 p.



REYNOLDS, C. A.; LAPPIN, M. R. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infections in 21 client-owned cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 43, n. 5, p. 249-257, 2007.

RISTIC, M.; KREIER J. P. 1984. Family III. Anaplasmataceae, p. 719–729. In Krieg, N. R. and Holt, J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

ROTSTEIN, D. S.; TAYLOR, S. K.; HARVEY, J. W.; BEAN, J. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 35, n. 3, p. 613-617. 1999.

SÁ, A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H.; MACIEIRA, D. B.; ABREU, F. S.; FERREIRA, R. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 4, n. 2, p. 163-168, 2006.

SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G.; JACOBSON, L. S.; PENZHORN, B. L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 72, p. 04-11, 2001.

SCOFIELD, A. Caracterizações morfológica, morfométrica e ultraestrutural de formas intraeritrocíticas de *Cytauxzoon felis simile*. Seropédica: UFRRJ, 2002. 56 f. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias).

SEAMER, J.; DOUGLAS, S. W. A new blood parasite of British cats. *The Veterinary Record*, v.71, n.20, p.405-408, 1959.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYDASA, S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Research in Veterinary Science*, v.14, p. 112-114. 1973.

SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 3, p. 193-209, 2001.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, v. 102, n. 3-4, p. 183-188. 2004.

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

SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G.; JACOBSON, L. S.; PENZHORN, B. L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 72, p. 04-11, 2001.

SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M.; HARVEY, J. W. Ultrastructure of erythrocytes parasitized by *Haemobartonella felis*. *Journal of Parasitology*, v. 64, n. 3, p. 504-511, 1978.

SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W.; LAWMAN, M. P. J.; MURRAY, J.; KOCAN, A. A.; CARLISLE, J. W. Ultrastructure of schizonts in the liver of cats with experimentally induced cytauxzoonosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, n. 2, p. 384-390. 1985a.

SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W.; CARLISLE, J. W. Ultrastructure of the intraerythrocytic stage of *Cytauxzoon felis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, n. 5, p. 1178-1180. 1985b.

SMALL, E.; RISTIC, M. Morphologic features of *Haemobartonella felis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 28, n.124, p. 845-851. 1967.

SOARES, C. O. Cytauxzoonose felina é diagnosticada e isolada pela primeira vez na América Latina. *Revista Clínica Veterinária*, v. 32, p. 56-58. 2001.

SOARES, C. O. Estudos biológico e clínico-patológico da citauxzoonose causada por *Cytauxzoon felis* símile (Apicomplexa: Theileriidae) no Brasil. Seropédica: UFRRJ, 2002. 150 f. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

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). Niterói: UFF, 2002. 167 f. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária - Cirurgia e Clínica Veterinária).

SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N. R. P. Cytauxzoonose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 2002. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária Editora, p. 70-78.

SPINOSA, H. S; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. 897 p.

SYKES, J. E.; BALL, L. M.; BAILIFF, N. L.; FRY, M. M. 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 27-30, 2005.

SYKES, J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, n. 4, p. 685-693, 2007a.

SYKES J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; KYLES, A. E.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Detection of mixed infections with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 19, n. 3, p. 250-255, 2007b.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006, cap. 77, p. 722-736.

TABOADA, J.; MERCHANT, S.R. Infecções por protozoários e outras causas. ETTINGER, S.J. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 1ª ed., 2 vols. São Paulo: Manole, 1997. p. 554-572.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 67, n. 12, p. 1277-1279, 2005.

TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS C. R.; JENSEN, W. A.; OLVER C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, v. 152, n. 7, p. 193-198, 2003.

TASKER, S.; BRADDOCK, J. A.; BARAL, R.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; MALIK, R. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 6, n. 6, p. 345-354, 2004.

TASKER, S.; LAPPIN, M. R. Update on hemoplasmosis. In: AUGUST, J. R. (Ed.): *Consultations in Feline Internal Medicine*. 5. ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006, cap. 63, p. 605-610.

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLES, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES T. J. Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 3, p. 653-661, 2006.

THOMSETT, L. R. *Eperythrozoon felis*: observations on incidence and relationship to external parasitism in the cat. *The Veterinary Record*, v.72, n.21, p.397-399, 1960.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. *The Five Minute Veterinary Consult - Canine and Feline*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 1287 p.

UILENBERG, G. Babesia - A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, p. 3-10, 2006.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 210-217.

VENABLE, J. M.; EWING, S. A. Fine structure of *Haemobartonella canis* and its relation to the host erythrocyte. *Journal of Parasitology*, v. 54, p. 259-268, 1968.

VERDON, D. *C. felis* spreads without cure. *DVM Newsmagazine*. June, 2002. 1 p. <<http://www.dvmnews.com/dvm/article/articleDetail.jsp?id=21753>> Acesso em 28/04/2008.

WAGNER, J. E. A fatal Cytauxzoonosis-like disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 168, n. 7, p. 585-588. 1976.

WAGNER, J. E.; MOREHOUSE, L. G. Animal susceptibility studies with a *Cytauxzoon* agent of feline origin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 168, n. 9, p. 1135. 1976.

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

WALKER, D. B.; COWELL, R. L. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 206, n. 9, p. 1363-1365. 1995.

WATANABE, M.; HISASUE, M.; HASHIZAKI, K.; FURUICHI, M.; OGATA, M.; HISAMATSU, S.; OGI, E.; HASEGAWA, M.; TSUCHIYA, R.; YAMADA, T. Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 65, p. 1111-1114, 2003.

WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, W. J.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 5, p. 687-691, 2001.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. L.; REUSCH, C. LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, 2005.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F. S.; DOHERR, M. G.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, 2006a.

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

WILLI, B.; FILONI, C.; CATAO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTINEZ F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORGIS, M. P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, 2007a.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; MELI, M. L.; BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; HEGGLIN, D.; PUORGER, M.; NEIMARK, H.; CATTORI, V.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 12, p. 3798-3782, 2007b.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; TASKER, S.; MELI, M. L.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*, v. 125, n. 3-4, p. 197-209, 2007c.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; HAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, 2005.

YABSLEY, M. J.; MURPHY, S. M.; CUNNINGHAM, M. W. Molecular detection and characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* species in cougars from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 42, p. 366-374, 2006.

YU, D-H.; KIM, H-W.; DESAI, A-R.; HAN, I-A.; LI, Y-H.; LEE, M-J.; KIM, I-S.; CHAE, J-S.; PARK, J. Molecular detection of feline hemoplasmas in feral cats in Korea. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 69, n. 12, p. 1299-301. 2007.

ZINKL, J. G.; MCDONALD, S. E. *Cytauxzoon*-like organisms in erythrocytes of two cheetahs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 79, n. 11, p. 1261-1262. 1981.

ZULTY, J. C.; KOCIBA, G. J. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 6, p. 907-910, 1990.

**ANEXOS**

**Anexo 1:** Valores de referência utilizados neste estudo para os parâmetros hematológicos de gatos domésticos.

---

**Valores de referência**

---

Hematimetria	5-10x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
Hemoglobinometria (Hb)	8-15 g/dl
Volume Globular	24-45%
Volume Globular Médio (VGM)	39-55 fL
Concentração de hemoglobina globular média (CHGM)	30-36%
Plaquetometria	200.000-400.000/mm <sup>3</sup>
Leucometria Global (LG)	5.500-19.500/mm <sup>3</sup>
PPT	6,0-8,0 g/dL
Leucometria Específica Absoluta	
Basófilos	Raros
Eosinófilos	0 a 1.500 /mm <sup>3</sup>
Mielócitos	Ausente
Metamielócitos	Ausente
Bastões	0 a 300/mm <sup>3</sup>
Segmentados	2.500 a 12.500 /mm <sup>3</sup>
Linfócitos	1.500 a 7.000/mm <sup>3</sup>
Monócitos	0 a 850/mm <sup>3</sup>

---

Fonte: JAIN, 1993a.

# 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](#)