UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

LEVANTAMENTO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DE DIARREIA EM GATOS DOMICILIADOS DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

JAMILLE BATISTA FARIA PRADO

CAMPO GRANDE, MS
2018

JAMILLE BATISTA FARIA PRADO

LEVANTAMENTO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DE DIARREIA EM GATOS DOMICILIADOS DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Veronica Jorge Babo Terra
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos

CAMPO GRANDE, MS
2018

Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)

Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito, às catorze horas, na sala F da pós-graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Veronica Jorge Babo Terra (UFMS), Heitor Miraglia Herrera (UCDB) e Vagner Ricardo da Silva Fiuza (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **JAMILLE BATISTA FARIA PRADO**, CPF 03998549161, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título **"LEVANTAMENTO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DE DIARREIA EM GATOS DOMICILIADOS DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL"** e orientação de Veronica Jorge Babo Terra. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Veronica Jorge Babo Terra		APROVADA
Dr. Heitor Miraglia Herrera		Aprovado
Dr. Vagner Ricardo da Silva Fiuza		APROVADA
Dr. Fernando de Almeida Borges (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

[X] Aprovação [ ] Aprovação com revisão [ ] Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Sem observações.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora **Aluna**

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Ocorrência dos principais agentes infecciosos causadores de diarréia em uma população de gatos domésticos em Campo Grande, Mato Grosso do Sul", registrada com o nº 787/2016, sob a responsabilidade de **Verônica Jorge Babo-Terra** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 8ª reunião ordinária do dia 14/09/2016.

FINALIDADE	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/08/2016 a 1º/05/2017
Espécie/Linhagem/Raça	*Felis catus*
Nº de animais	80
Peso/Idade	Qualquer
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 15 de setembro de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
http://www.propp.ufms.br/ceua
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7925

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse estudo se tornasse possível:

Primeiramente a Deus por me dar força para enfrentar os desafios do dia a dia e vencer todas as dificuldades.

Aos meus pais Nilda e Geovano que sempre me incentivaram e deram forças para que eu não desistisse de ir atrás do que eu buscava para minha vida.

Às minhas irmãs Giovanna e Nicolle, por todo apoio e por acreditarem na minha capacidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Veronica Jorge Babo Terra e meu Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos por todo apoio, ensinamento, paciência, generosidade, dedicação e exigência durante a minha jornada.

Aos colegas de laboratório por todo auxílio, paciência e conhecimento compartilhado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aos professores pelos ensinamentos e dedicação.

Resumo

PRADO, J. B. F. Levantamento parasitológico e molecular de agentes infecciosos causadores de diarreia em gatos domiciliados de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 2018. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Diarreia é um quadro clínico comum em felinos domésticos e possui etiologia variada, sobretudo de origem infecciosa. Objetivou-se neste estudo identificar a ocorrência e os fatores de risco de agentes infecciosos associados à diarreia em gatos domiciliados e investigar a presença de *Enterocytozoon bieneusi* em gatos domiciliados provenientes de Campo Grande, região centro-oeste do Brasil. De setembro de 2016 a maio de 2017, setenta amostras de fezes diarreicas de gatos domiciliados foram coletadas e processadas nos laboratórios de Doenças Parasitárias e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, utilizando o método de Faust e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), respectivamente. O parasitosmo por *Ancylostoma* spp. foi identificado em 17% dos animais amostrados. Os protozoários foram os parasitos mais frequentes, principalmente *Cystoisospora* spp. e *Giardia intestinalis,* diagnosticados pela técnica de Faust. Dentre os fatores de risco avaliados, gatos com diarreia crônica e que não possuíam acesso à rua, estavam significativamente associados à presença de *G. intestinalis*. A técnica molecular de PCR melhorou a cobertura de diagnóstico, pela detecção de agentes patogênicos não identificados pelo exame parasitológico, tais como *Cryptosporidium felis*, *Parvovirus* spp. e *Enterocytozoon bieneusi.* Além disso, a análise por biologia molecular permitiu a identificação do genótipo D de *E. bieneusi,* potencialmente zoonótico. Sendo assim, é possível constatar que os gatos domiciliados de Campo Grande-MS também são capazes de dispersar agentes patogênicos como de grande importância em saúde pública.

Palavras-chave: enteropatias, felinos, coproparasitológico, PCR, zoonose.

Abstract

PRADO, J. B. F. Parasitological and molecular survey of infectious agents causing diarrhea in cats domiciled in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. 2018. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Diarrhea is a common clinical picture in domestic cats and has a varied etiology, especially of infectious origin. The objective of this study was to identify the occurrence and risk factors of infectious agents associated with diarrhea in domiciled cats and to investigate the presence of *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Campo Grande, central-western Brazil. From September 2016 to May 2017, seventy diarrheic stool samples from domiciled cats were collected and processed in the Laboratories of Parasite Diseases and Molecular Biology of Federal University of Mato Grosso do Sul, using Faust and Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques, respectively. The parasitosis by *Ancylostoma* spp. was identified in 17% of the animals sampled. The protozoa were the most frequent parasites, mainly *Cystoisospora* spp. and *Giardia intestinalis*, diagnosed by Faust technique. Among the risk factors evaluated, cats with chronic diarrhea and that did not have access to the outdoor environment were significantly associated with the presence of *G. intestinalis*. The molecular PCR technique improved the diagnostic coverage by detecting pathogens not identified by parasitological examination, such as *Cryptosporidium felis*, Parvovirus spp. and *Enterocytozoon bieneusi*. In addition, molecular analyses allowed the identification of *E. bieneusi* genotype D, a potentially zoonotic genotype. Thus it is possible to assert that domiciled cats are also able to disperse pathogens of great importance in public health.

Keywords: enteropathies; feline; coproparasitological; PCR; zoonosis.

Lista de figuras

Figura 1- Oocisto de Cystoisospora spp. em fezes de gato com diarreia, corado com lugol, 400x 14

Figura 2- Cisto de Giardia intestinalis em fezes de felino com diarreia, corado com lugol, 400x 15

Figura 3- Gel de agarose 2%, corado com Gel Red, mostrando produtos de nested PCR de aproximadamente 392pb de DNA de *Enterocytozoon bieneusi* 26

Figura 4- Gel de agarose 2%, corado com Gel Red, mostrando produtos de *nested* PCR de aproximadamente 864 pb de DNA de *Criptosporidium felis*, em 3, 8 e 9 45

Lista de tabelas

Tabela 1- Agentes e iniciadores utilizados para identificação de patógenos no presente estudo..... 39

Tabela 2- Tipo de infecção e ocorrência dos agentes patogênicos em amostras fecais diarreicas de gatos, identificados pelas Técnicas de Faust (n=70) e PCR/sequenciamento (n=60), no período de setembro de 2016 a maio de 2017, em Campo Grande-mS..... 41

Tabela 3- Co-infecções parasitárias encontrados em amostras fecais de gatos através do exame parasitológico de Faust e PCR, no período de setembro de 2016 a maio de 2017, em Campo Grande- MS 42

Tabela 4- Fatores de risco associados à presença de *Giardia intestinalis* em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS 44

Tabela 5- Fatores de risco associados à presença de *Cryptospordium felis* em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS 46

Tabela 6- Fatores de risco associados à presença de *Parvovírus* spp. em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS 47

Tabela 7- *Enterocytozoon bieneusi* genotypes only found in cats …… 59

Tabela 8- *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in cats and other hosts……... 59

Tabela 9- *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in cat and human (and other host in some genotypes)…….. 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
2 REVISÃO DE LITERATURA 11
2.1 Diarreia 11
2.2 Fisiopatologia da diarreia 11
2.2.1 Diarreia osmótica 12
2.2.2 Diarreia secretória 12
2.2.3 Diarreia associada à motilidade 12
2.2.4 Diarreia exsudativa 13
2.3 Etiologia 13
2.3.1 Protozoários 13
2.3.1.1 *Cystoisospora* spp. 14
2.3.1.2 *Giardia intestinalis* 15
2.3.1.3 *Cryptosporidium* spp 16
2.3.1.4 *Tritrichomonas foetus* 17
2.3.1.5 *Toxoplasma gondii* 17
2.3.2 Helmintos 18
2.3.2.1 *Ancylostoma* spp 18
2.3.2.2 *Toxocara* spp. 19
2.3.3 Bactérias 19
2.3.3.1 *Salmonella* spp. 20
2.3.3.2 *Campylobacter* spp 20
2.3.4 Vírus 21
2.3.4.1 Parvovírus felino 21
2.3.5 Microsporídios 21
2.3.4.1 *Enterocytozoon bieneus* 22
2.4 Métodos de diagnóstico 22
2.4.1 Exames coproparasitológicos 23
2.4.1.1 Técnica de Willis 23

2.4.1.2 Exame direto 23
2.4.1.3 Técnica de Faust 24
2.4.2 Método molecular 24
2.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 24
2.4.2.2 PCR de fezes 26
3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo Geral 28
3.2 Objetivos Específicos do primeiro capítulo 28
3.3 Objetivos Específicos do segundo capítulo 28
4. REFERÊNCIAS 29
5. CAPÍTULO 1 35
6. CAPÍTULO 2 53
ANEXOS 67
Anexo 1 67

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é definida como a diminuição da consistência das fezes pelo aumento de líquido no lúmen intestinal (ETTINGER; FELDMAN, 2004). É bastante comum em gatos domésticos e pode ocorrer como resultado de desordens no trato gastrointestinal incluindo causas nutricionais, infecciosas, inflamatórias ou neoplásicas (PARIS et al., 2013).

Vários enteropatógenos potenciais foram encontrados em fezes de felinos com diarreia, incluindo bactérias, vírus, protozoários e helmintos (PARIS et al., 2013). Dentre os principais agentes infecciosos causadores de diarreia em gatos citam-se *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Cystoisospora* spp., *Tritrichomonas foetus, Salmonella* spp*., Campylobacter* spp., parvovírus felino e coronavírus entérico felino. Alguns destes são de grande relevância na saúde pública, devido ao potencial zoonótico.

São escassas as informações acerca da frequência de ocorrência de muitos patógenos causadores de diarreia em gatos, sobretudo no Brasil. A maioria dos estudos tem por objetivo o diagnóstico de helmintos e alguns protozoários, detectados por meio de técnicas coproparasitológicas tradicionais, deixando de lado outros agentes infecciosos não detectados por essas técnicas, como vírus e bactérias. Os estudos no Brasil em sua maioria envolvem cães, como o estudo realizado por Gizzi et al. (2014), no estado do Paraná, que determinou a frequência de agentes infecciosos em fezes de cães com diarreia por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Quando se trata de agentes como *Tritrichomonas sp., Cryptosporidium* spp*.* e *T. gondii*, as técnicas coproparasitológicas, tais como Wiliis, Faust e exame direto, rotineiramente utilizadas em laboratórios de parasitologia são em geral, insuficientes para descartar a infecção, dada a dificuldade de visualização dos agentes. Além disso, não permitem diagnosticar outros agentes como vírus e bactérias que necessitam de técnicas especiais para seu diagnóstico como isolamento viral e cultura microbiológica, respectivamente. Dessa maneira, as técnicas de biologia molecular, notadamente a PCR seguido do sequenciamento de DNA, são bastante apropriadas para a identificação destes agentes de forma mais precisa. A maior

sensibilidade e especificidade das técnicas reduzem o risco de resultados falsos-negativos, e, até mesmo, diagnóstico falso-positivo.

Portanto, no presente estudo utilizou-se a PCR, associada à técnica parasitologia de Faust, para identificar a ocorrência e os fatores de risco de agentes infecciosos associados a quadros de diarreia em gatos domiciliados no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diarreia

A diarreia (da palavra grega "fluir através") é definida como trânsito rápido de conteúdo gástrico através do intestino (WHYTE; JENKINS, 2012). É resultado de conteúdo aquoso excessivo e constitui o sinal clínico mais importante de enteropatias em gatos, caracterizada por elevação na frequência, aumento na fluidez e no volume das fezes (ETTINGER; FELDMAN, 2004; SHERDING; JOHNSIN, 2008). Sua classificação com base na gravidade, cronicidade e localização do segmento intestinal que origina a diarreia é clinicamente útil, a fim de determinar a causa ou agente etiológico, direcionando a abordagem diagnóstica e também a seleção da terapêutica inicial (NORSWORTHY et al., 2009).

É considerado um problema bastante comum na prática clínica de felinos, particularmente em filhotes, os que vivem em aglomerados e aqueles que têm acesso à rua (COOK, 2008). Pode ser considerada grave quando seus parâmetros indicarem perda de 10% ou mais de peso corporal, desidratação, depressão, distúrbios eletrolíticos significativos, alterações na temperatura corporal, seja hipotermia ou pirexia e, laboratorialmente, neutrofilia ou neutropenia (NORSWORTHY et al., 2009). Nesses casos, não é rara a ocorrência de óbito em animais jovens que rapidamente desidratam e, por falta de diagnóstico preciso não respondem ao tratamento.

2.2 Fisiopatologia da diarreia

O trato gastrointestinal possui um processo de absorção e secreção de água bem equilibrado e dinâmico e, quando há perda desse equilíbrio decorrente da diminuição da absorção e aumento da secreção, ocorre diarreia (WHYTE; JENKINS, 2012). Há quatro tipos fisiopatológicos de diarreia (osmótica, secretória, exsudativa e a peristáltica), e a determinação de tais mecanismos auxilia na escolha do melhor suporte terapêutico ao paciente (NORSWORTHY et al., 2009).

2.2.1 Diarreia osmótica

A diarreia osmótica é causada por um aumento nos solutos não absorvidos no lúmen intestinal, esses solutos são osmoticamente ativos e retêm água causando distensão, sendo expelida em forma de diarreias líquidas e volumosas. Esse aumento de solutos não absorvidos é resultado de sobrecarga dietética, má digestão/má absorção por insuficiência pancreática exócrina, por exemplo, e doença da mucosa intestinal como enteropatia inflamatória. Carboidratos pouco absorvíveis e laxativos são exemplos de substâncias osmoticamente ativas (NORSWORTHY et al., 2009).

2.2.2 Diarreia secretória

Grandes volumes de água são normalmente secretados no lúmen do intestino delgado, mas a grande maioria dessa água é eficientemente absorvida antes de atingir o intestino grosso. A diarreia secretória ocorre quando a secreção de água no lúmen intestinal excede a absorção. Esse aumento de secreção de líquido pode ser resultado de enterotoxinas bacterianas, agonistas colinérgicos, ácidos biliares desconjulgados e hidroxiácidos graxos que alteram a funcionalidade da bomba de NaCl-ATPase, permitindo secreção descontrolada de água (NORSWORTHY et al., 2009).

2.2.3 Diarreia associada à motilidade

A motilidade alterada leva a diarreia como resultado da redução da absorção de líquidos devido ao encurtamento do tempo de contato entre o epitélio absortivo intestinal e o conteúdo luminal (tempo de trânsito gastrointestinal reduzido). A causa, geralmente, é uma diminuição na segmentação rítmica e, com menos frequência, um aumento no peristaltismo. A motilidade alterada pode contribuir para os outros mecanismos de diarreia e, raramente, é o distúrbio primário causador da diarreia, como a síndrome do intestino irritável e a disautonomia (NORSWORTHY et al., 2009).

2.2.4 Diarreia exsudativa

A diarreia exsudativa ocorre quando há um aumento na permeabilidade da mucosa intestinal causada por doenças que a lesionam ou a destroem, levando a má digestão, diminuindo a absorção e permitindo o extravasamento de líquidos, eletrólitos e grandes partículas para o lúmen (NORSWORTHY et al., 2009).

Essa alteração na permeabilidade pode ser causada por úlceras/erosões decorrente do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, infiltração da mucosa por neoplasias (linfoma) e inflamação/infecção da mucosa por agentes infecciosos, como exemplos bactérias (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp*.)*, vírus (rotavírus, coronavírus, parvovírus canino e felino) e protozoários (*Cystoisospora* spp., *Cryptosporium* spp., *Giardia* spp.) (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3 Etiologia

A diarreia é um quadro clínico comum em gatos domésticos e possui etiologia variada, podendo ser desencadeada por estresse, distúrbios eletrolíticos, nutricionais, dieta, neoplasia e doença inflamatória. Ainda, agentes patogênicos como parasitos, bactérias, protozoários, vírus e coinfecções. Ainda, a diarreia pode ocorrer como consequência de distúrbios hepático ou pancreático os quais interferem os processos digestivos e absortivos (ETTINGER; FELDMAN, 2004; PAYNE; ARTZER, 2009; PARIS et al., 2013). A seguir são mecionados os principais agentes infecciosos causadores de diaréia no gato doméstico.

2.3.1 Protozoários

As diarreias causadas por protozoários são bastante frequentes em gatos, principalmente as diarreias crônicas, uma vez que não são considerados nas vermifugações de rotina (DOSSIN, 2009).

2.3.1.1 *Cystoisospora* spp.

Cystoisospora spp. são protozoários pertencentes à classe dos coccídios, com muitas espécies e ampla variedade de hospedeiros (URQUHART et al., 1998). Seus oocistos são eliminados nas fezes dos hospedeiros e seu tamanho varia em aparência microscópica (Figura 1), que pode ser usado para identificar a espécie causadora (LAPPIN, 2010). Os gatos são hospedeiros definitivos das espécies *C. felis* e *C. rivolta*, que se localizam no intestino delgado, ceco e cólon desses animais (URQUHART et al., 1998; LAPPIN, 2010).

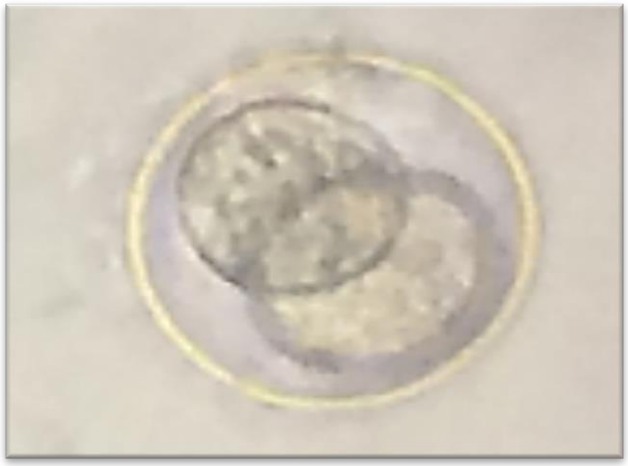

Figura 1- Oocisto de Cystoisospora spp. em fezes de gato com diarreia, corado com lugol, 400x.(Fonte: Arquivo pessoal).

A infecção ocorre pela ingestão dos oocistos esporulados no ambiente ou cistos monozoicos presentes nos hospedeiros paratênicos como camundongos, ratos, pássaros, entre outros (DUBEY; FRENKEL, 1972; BOWMAN, 2010). Após sua ingestão, o protozoário parasita as células epiteliais do intestino, levando a quadros de diarreias de consistência mucosa que levam à rápida desidratação, diminuição de apetite e emagrecimento, podendo ocasionar até a morte dos animais, principalmente em animais jovens, debilitados ou imunocomprometidos (LOSS, 1991; LAPPIN, 2010).

2.3.1.2 *Giardia intestinalis*

A giardíase é a infecção causada pelo protozoário gênero *Giardia* spp. que parasita o intestino delgado na sua forma de trofozoíto e é eliminada nas fezes como um cisto oval alongado (Figura 2) (CHANDER, et al., 2006). Possui distribuição mundial e infecta uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem (PAYNE; ARTZER, 2009; ANJOS et al., 2013). De acordo com a taxonomia, inúmeras espécies de *Giardia* spp. foram inicialmente descritas (mais de 51), no entanto, classificações atuais descrevem 6 espécies diferentes distribuídas em três grupos morfológicos (CACCIO; LALLE, 2015). A espécie *G.intestinalis,* é descrita como sinônima de *G. lamblia* e *G. duodenalis* (PAYNE; ARTZER, 2009). Essa espécie possui diferentes genótipos (A-H) encontrados tanto em humanos quanto em animais, contudo alguns são hospedeiro-específicos, sendo que os gatos podem albergar o genótipo F, raramente encontrado nos humanos (SCORZA; LAPPIN, 2010).

Figura 2- Cisto de Giardia intestinalis em fezes de felino com diarreia, corado com lugol, 400x. (Fonte: Arquivo pessoal)

Desconhece-se a importância do gato como reservatório para infecções humanas, mas trabalhos recentes citam similaridade entre a *G.intestinalis*. presente no homem e em muitas espécies animais, indicando grande possibilidade de transmissão entre diferentes espécies (BOWMAN, 2010). Esse protozoário sobrevive por meses no ambiente e é transmitido pela ingestão oral de cistos a partir de fezes,

alimentos e/ou água contaminada, o que também a caracteriza como uma doença de veiculação hídrica (ETTINGER; FELDMAN 2004; NORSWORTHY et al., 2009).

. Embora a maioria dos gatos permaneça assintomática pela infecção de *Giardia* (THOMPSON et al., 2008), o quadro clínico da infecção em animais é altamente variável e pode incluir tanto diarreia aguda quanto crônica, náusea, perda de peso e, raramente, desidratação, letargia e anorexia (NORSWORTHY et al., 2009). Em animais adultos, a infecção costuma ser assintomática, e raramente é detectada, sendo estes animais os prováveis disseminadores no ambiente (THOMPSON et al., 2008).

2.3.1.3 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. são protozoários, atualmente classificados como gregarinas (RYAN et al., 2016), que colonizam a borda das células epiteliais do intestino delgado, onde se reproduzem e eliminam os oocistos (NORSWORTHY et al., 2009). Esses protozoários podem parasitar um grande número de espécies de vertebrados: aves, répteis, peixes e mamíferos, tais como gato e até mesmo humano (FAYER et al., 2000; SMITH et al., 2007). O gênero *Cryptosporidium* compreende 32 espécies descritas (HOLUBOVÁ et al. 2016; ZAHEDI et al., 2016; ZAHEDI et al., 2017), sendo que os gatos são acometidos principalmente por *C. felis* (THOMPSON et al., 2008; LUCIO-FOSTER, 2010).

Os gatos se tornam infectados através da ingestão de oocistos esporulados presentes nas fezes, alimento ou água contaminados (NORSWORTHY et al., 2009). Em gatos a doença clínica geralmente é assintomática, mas quando presente caracteriza-se pela apresentação de episódios recorrentes de diarreia aquosa que às vezes pode ser tornar profusa e prolongada, anorexia, perda de peso, desidratação e fraqueza (CURRENT; GARCIA, 1991; NORSWORTHY et al., 2009).

Os humanos também são susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium parvum*, representando risco à saúde pública, principalmente se os animais e humanos forem imunossuprimidos, como os portadores de HIV e idosos (COELHO, 2009; LUCIO-FORSTER, 2010; GALVÃO et al., 2012; PEREIRA; FERREIRA, 2012).

2.3.1.4 *Tritrichomonas foetus*

Classificados como flagelados de mucosa, de acordo com Bowman (2010), *Tritrichomonas* spp. são protozoários que coloniza o lúmen intestinal do cólon, formando colônias próximas à superfície da mucosa (PAYNE; ARTZER, 2009). *Tritrichomonas foetus* é conhecido por ocasionar problemas reprodutivos em bovinos e foi recentemente identificado como causador de diarreias em gatos, principalmente os que vivem em alta densidade populacional (FOSTER et al., 2004; GOOKIN et al. 2002; COOK, 2008; HOSEIN et al., 2013). Gookin et al. (2002) examinaram um número considerável de gatos com tricomonose e observaram maior incidência da infecção em gatos jovens com menos de um ano de idade.

A transmissão do parasita é oral-fecal e ocorre pela ingestão de trofozoítos presentes no ambiente. Yao e Köster (2015) descrevem ser comum a contaminação pela utilização de caixa de areia por mais de um gato. Os sinais clínicos incluem diarreia fétida, pastosa a semiformada, podendo conter sangue e muco (NORSWORTHY et al., 2009). É comum o diagnóstico ser dado erroneamente como *Giardia* spp., devido à semelhança de ambos os parasitos nos exames coproparasitológicos (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3.1.5 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório com pouca especificidade, pois infecta provavelmente todos os animais homeotérmicos e vários tipos celulares (DUBEY, 2010). Entretanto, somente os felídeos representam os hospedeiros em que ocorre a reprodução sexuada por gametogonia e consequente formação e liberação de oocistos junto com as fezes (BICHARD; SHERDING, 1998; NORSWORTHY et al., 2009). Estes se mantêm viáveis no ambiente e se tornam infectantes para os próprios gatos, e também para outros hospedeiros intermediários como o homem, cães e roedores que se infectam pela ingestão de oocistos presentes no solo, ou alimentos como vegetais ou carnes com cistos tissulares (BICHARD; SHERDING, 1998). Os gatos geralmente se infectam pela ingestão de bradizoítos encistados nos tecidos de hospedeiros intermediários, como os

roedores, no momento em que iniciam a atividade predatória, ainda filhotes, ou menos comumente pela ingestão de oocistos em água e alimentos contaminados (BICHARD; SHERDING, 1998; NORSWORTHY et al., 2009).

Em geral, os gatos disseminam grandes quantidades de oocistos durante uma a duas semanas, após o primeiro contato com o parasita, e apresentam apenas um episódio de eliminação durante a vida, principalmente na fase jovem (NORSWORTHY et al., 2009). Depois, tornam-se relativamente imunes, de forma que, quando se infectam pela segunda vez, podem eliminar um número reduzido de *T. gondii* (DUBEY, 2010). A diarreia no momento da eliminação dos oocistos é de rara ocorrência (SCORZA; LAPPIN, 2010). Na maioria dos gatos, a doença clínica é rara, embora tenham sido registrado enterite, linfonodos mesentéricos infartados, pneumonia, alterações degenerativas no sistema nervoso central e encefalite (NAVARRO et al., 1998).

2.3.2 Helmintos

As helmintoses constituem um grave problema na clínica de cães e gatos, devido à alta prevalência e por algumas delas serem consideradas zoonoses ((MUNDIM et al., 2004; RIBEIRO, 2004). O parasitismo por helmintos é frequentemente subclínico, exceto em filhotes ou gatos adultos imunocomprometidos (MUNDIM et al., 2004; NORSWORTHY et al., 2009). A eliminação dos ovos nas fezes pode ser de maneira intermitente, por isso a vermifugação deve ser realizada em todos os filhotes (COOK, 2008).

2.3.2.1 *Ancylostoma* spp.

Os ancilostomas, conhecidos como vermes-ganchos são pequenos vermes nematoides que parasitam o intestino delgado (BOWMAN, 2010). Os gatos são parasitados por três espécies de *Ancylostoma*: *A. braziliense, A. tubaeforme* e *A. caninum*. As larvas desses parasitos podem infectar o homem, causando as síndromes conhecidas por larva *migrans* cutânea (MUNDIM et al., 2004).

Os gatos se infectam mais frequentemente pela via oral, mas pode ocorrer também pela via percutânea (RIBEIRO, 2004). Diferente do cão, a transmissão transmamária não ocorre no gato (BOWMAN, 2010). Quando as larvas infectantes são ingeridas penetram na parede intestinal, sofrem uma muda, retornam à luz intestinal e atingem a fase adulta, seus ovos são postos no lúmen intestinal e eliminados no ambiente com as fezes (RIBEIRO, 2004).

A maioria das helmintoses pode ser assintomática, mas quando presente, os sinais clínicos incluem diarreia, fezes escuras, vômitos, perda de peso ou incapacidade de ganhar peso e fraqueza devido a anemia, sendo mais comuns e graves em filhotes (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3.2.2 *Toxocara* spp.

Os helmiltos do gênero *Toxocara* spp.possuem 21 espécies que infectam uma veriedade de animais em todo o mundo (QUEIROZ; CHIEFFI, 2005). Entretanto , *T. cati* ou *T. canis*, os gatos são parasitados principalmente por, espécies de interesse em saúde pública também por causar síndrome da larva *migrans* (BOWMAN, 2010).

A infecção ocorre por rota oral-fecal por ingestão de ovos embrionados presentes no ambiente, ingestão de larvas nas fezes ou nos hospedeiros paretênicos, além disso, pode ocorrer transmissão transmamária (QUEIROZ; CHIEFFI, 2005). Após infectados os gatos, principalmente os filhotes liberam milhões de ovos no ambiente, dependendo do estado imune e da intensidade parasitária (GLICKMAN; SCHANTZ, 1981). Os sinais clínicos, podem variar, mas na maioria das vezes a infecção ocorre de forma assintomática (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3.3 Bactérias

As infecções bacterianas também têm sido relacionadas à diarreia em gatos. Embora várias espécies de bactérias tenham sido associadas com diarreia, identificar uma relação causal é difícil porque estas espécies podem estar presentes em condições clínicas normais (COOK, 2008).

2.3.3.1 *Salmonella* spp.

Salmonela spp. são bacilos gram-negativos móveis, não formadores de esporos que infectam uma ampla variedade de mamíferos, aves e répteis, levando a doença gastrointestinal, sistêmica ou infecção assintomática (NORSWORTHY et al., 2009). Os animais podem adquirir a infecção da mesma maneira que os humanos, por meio da ingestão de alimentos contaminados, tais como carne crua, aves ou produtos derivados (SAAD; FRANÇA, 2010) e também pela ingestão de fezes contaminadas (NORSWORTHY et al., 2009).

A manifestação clínica da salmonelose em gatos inclui gastroenterite aguda ou crônica, sepse, doença febril crônica sem sinais gatrointestinais ou infecções teciduais localizadas (NORSWORTHY et al., 2009). Immerseel et al. (2004) confirmaram em um estudo que gatos imunocomprometidos que excretam *Salmonella* spp. podem representar perigo para a saúde pública, como as crianças, os idosos e imunodeprimidos. Cepas de *Salmonella* resistentes a muitos antibióticos foram detectados em gatos (NELSON; COUTO, 2010), e acredita-se ser resultado do uso indiscriminado de antibióticos (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3.3.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. são bactérias gram-negativas, móveis, de formato curvo e não formadoras de esporos. São descritas mais de 37 espécies de *Campylobacter*, mas apenas algumas são patogênicas para os gatos, humanos e outras espécies. *Campylobacter jejuni* é a principal espécie de interesse causadora de enterite em gatos e embora não se multiplique no meio ambiente, pode sobreviver por longos períodos em água e resistir a baixas temperaturas (WEESE, 2011). No estudo de Giacomelli et al. (2015), a maioria dos gatos positivos para *Campylobacter* estava colonizada pelo *C. jejuni*. Este é um achado importante sob o ponto de vista da saúde pública, uma vez que o *C. jejuni* é a espécie mais frequentemente associada com gastroenterite humana (MOORE et al., 2005).

O microrganismo é adquirido pela ingestão de alimentos contaminados ou por contato com fezes de animais infectados, uma vez ingerido invade a mucosa do trato

intestinal, podendo causar enterocolite superficial erosiva. Os sinais clínicos são mais prováveis em animais com menos de 6 meses e geralmente consistem em diarreia mucóide, muitas vezes com sangue fresco (COOK, 2008).

2.3.4 Vírus

As diarreias virais são frequentemente vistas em gatos filhotes ou adultos recentemente introduzidos em ambientes multigatos, apresentando gastroenterite aguda acompanhada de febre (COOK, 2008).

2.3.4.1 Parvovírus felino

As diarreias virais causadas pelo vírus da panleucopenia felina são observadas principalmente em filhotes e gatos recém introduzidos no ambiente. A panleucopenia caracteriza-se por ser altamente contagiosa, com alta morbidade e mortalidade em felinos não vacinados com menos do que 12 a 16 semanas; é raramente observada em gatos idosos (COOK, 2008). A transmissão pode ocorrer por contato direto entre gatos infectados ou por meio do contato com o vírus do ambiente (NORSWORTHY et al., 2009).

Os sinais iniciais incluem febre e aparecimento agudo de vômitos, de forma que os gatos tornam-se deprimidos e rapidamente desidratam (GREENCE et al., 2006; COOK, 2008). Semelhantemente, como acontece na parvovirose canina, em gatos, a diarreia líquida pode não ocorrer até um estágio mais avançado da doença, e pode apresentar-se sanguinolenta e com restos da mucosa intestinal (NORSWORTHY et al., 2009).

2.3.5 Microsporídios

Os microsporídios, recentemente reclassificados como fungos, são patógenos intracelulares obrigatórios (JAMSHIDI et al., 2012). Possui mais de 1.200 espécies descritas e infectam uma variedade de hospedeiros invertebrados e

vertebrados, incluindo o homem (SANTIN; FAYER, 2011). Atualmente, são conhecidas 17 espécies capazes de infectar o homem, mas *Enterocytozoon bieneusi* é reconhecidamente a mais patogência, além de já ter sido encontrada em uma ampla variedade de animais, inclusive em gatos (MATHIS et al., 2005; FAYER; SANTIN, 2014).

2.3.4.1 *Enterocytozoon bieneus*

E. bieneusi inicialmente considerado um agente patogênico específico do ser humano, recentemente foi relatado em uma variedade de animais domésticos no mundo todo (Fayer e Santin, 2014). É um patógeno oportunista que infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos, e causa sinais clínicos associados à diarreia crônica (MATHIS et al., 2005). A transmissão ocorre principalmente por via oral-fecal, por meio do contato direto com esporos eliminados por animais ou humanos infectados ou pela ingestão de água e alimentos contaminados (SANTIM; FAYER, 2011)

No Brasil, *E. bieneusi* foi previamente relatado em humanos, suínos, bovinos, ovinos e aves (Feng et al., 2011; Fiuza et al., 2015, Fiuza et al., 2016a; Fiuza et al, 2016b; Lallo et al., 2012).).Apesar de amplamente distribuído no mundo e em grande variedade de hospedeiros, inclusive no homem, informações a respeito da prevalência em gatos no continente americano, sobretudo no Brasil, são escassos.

2.4 Métodos de diagnóstico

A diarreia é um dos sinais clínicos mais comuns apresentadas aos médicos veterinários na rotina clínica. Muitas vezes o manejo e o diagnóstico definitivo, principalmente das diarreias crônicas e intermitentes estão entre os aspectos mais frustrantes e desafiadores da prática clínica da medicina de pequenos animais. Isto se deve principalmente em função da grande variedade de patógenos, ausência de sinais clínicos específicos e presença concomitante de infecções por vírus, bactérias e protozoários (TAMS, 2005).

O exame clínico é o primeiro passo para o diagnóstico, mas o exame laboratorial é essencial, estabelecendo a espécie de parasito presente no paciente e, consequentemente, o tipo de medicamento a ser utilizado pelo clínico durante o tratamento (NEVES et al., 2005).

2.4.1 Exames coproparasitológicos

Os exames parasitológicos de fezes são importantes para o diagnóstico do agente etiológico da diarreia e devem envolver a inspeção visual das fezes e se há a presença de sangue, muco e corpo estranho (SHERDING; JOHNSON, 2008). As fezes de animais que apresentam diarreia devem ser examinadas para parasitos intestinais (*Giárdia*, coccídios, ancilóstomo e tricurídeos) (BATT, 2009).

2.4.1.1 Técnica de Willis

A técnica de Willis ainda é o recurso laboratorial mais utilizado, devido à fácil execução e baixo custo. Consiste em um método de flutuação simples em solução saturada de açúcar ou cloreto de sódio, sendo bastante utilizada para evidenciar a presença de ovos leves nas fezes, como os de Ancilostomídeos (WILLIS, 1921).

2.4.1.2 Exame direto

O Método Direto é utilizado para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos de helmintos, porém é pouco sensível e apresenta resultados positivos em infecções massivas. É específico para pesquisa de trofozoítos nas fezes frescas. (HOFFMANN, 1987). O exame direto tem como principais desvantagens o fato de avaliar uma quantidade muito pequena de fezes (BOWMAN, 2010).

2.4.1.3 Técnica de Faust

Dentre várias técnicas coproparasitológicas, a técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco (Faust) é a técnica de escolha na detecção de estruturas leves como cistos e oocistos de protozoários e também ovos leves de alguns helmintos, o que sugere ser uma técnica com boa sensibilidade diagnóstica (FAUST et al., 1938).

2.4.2 Método molecular

O uso de técnicas de biologia molecular, em particular os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilita vantagens em relação a outras técnicas por apresentar maior sensibilidade e especificidade. Desta forma, torna-se um instrumento de diagnóstico valioso, principalmente na capacidade em detectar agentes infecciosos, porém sem determinar a viabilidade dos parasitas encontrados na amostra biológica (FUNADA, 2007; DANIELS, 2013; HAAS; TORRES, 2016).

2.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas últimas décadas, a PCR tornou-se uma das mais poderosas ferramentas de biologia molecular. Essa técnica pode ser utilizada para o diagnóstico de infecções ou doenças hereditárias e também para análises genéticas através de pequena porção de DNA em diversos tipos de amostras clínicas, tais como sangue, secreções, leite, tecidos e até mesmo de fezes (SCHRADER et al., 2012; HASS; TORRES, 2016).

De maneira geral, a PCR consiste na amplificação exponencial *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos (DNA/RNA) do agente infeccioso causal, que a partir de uma fita molde é possível gerar até cem bilhões de moléculas simulares em uma reação (SAIKI et al., 1988; DANIELS, 2013).

A reação abrange a utilização dos quatro desoxibonucleotídeos (dNTPs) do DNA (A-T-C-G); par de iniciadores específicos (*primers)* compreendendo na sequência de nucleotídeos complementares às sequências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado; uma enzima *Taq* DNA polimerase termoestável (extraída da bactéria extremófila *Thermus aquaticus* que é encontrada em fontes hidrotermais) a qual alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples (*primer*); cloreto de magnésio (MgCl2), um cofator para atividade da *Taq* DNA polimerase; um tampão, geralmente cloreto de potássio (KCl), para manter pH e condição adequada para atividade enzimática; água ultrapura como diluente e por fim o DNA molde, previamente extraído da amostra clínica suspeita (HASS; TORRES, 2016).

A técnica consiste basicamente em três ciclos: 1) desnaturação das fitas de DNA pelo calor; 2) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (senso e anti-senso) ao DNA molde; 3) síntese do DNA específico utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase- processo de extensão e polimerização da fita (DANIELS, 2013). A cada ciclo, a quantidade de fragmentos de DNA na reação dobra, permitindo a amplificação de milhares de segmentos específicos de DNA (HASS; TORRES, 2016). As moléculas amplificadas pela técnica da PCR são facilmente detectadas e identificadas pela eletroforese (Figura 3).

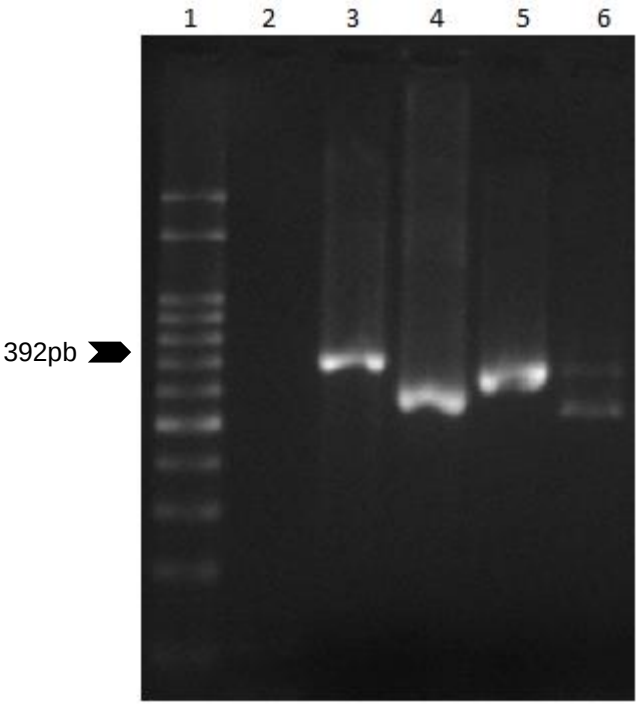

Figura 3- Gel de agarose 2%, corado com Gel Red, mostrando produtos de nested PCR de aproximadamente 392pb de DNA de *Enterocytozoon bieneusi.*(Fonte: arquivo pessoal).

2.4.2.2 PCR de fezes

A PCR é cada vez mais utilizada como método padrão na detecção e caracterização de microorganismos. No entanto, o método é propenso a substâncias inibidoras, que podem estar presentes na amostra analisada e que pode afetar a sensibilidade do ensaio ou mesmo levar a resultados falso-negativos (SCHRADER et al., 2012).

Amostras fecais apresentam grande quantidade de inibidores, tais como produtos metabólicos, polissacarídeos, compostos húmicos, bilirrubina, urobilinogênio e sais biliares (GOSH et al., 2000). A pureza do material extraído é a peça chave para a sensibilidade da reação, tanto para agentes patogênicos e não patogênicos (McORIST et al., 2002), mas os problemas são frequentemente encontrados em termos de baixo rendimento de DNA e/ou recuperação de DNA isento de substâncias inibitórias (WARD; WANG, 2001).

De acordo com Widmer (1998), existem alguns métodos para a remoção ou diminuição de substâncias inibitórias na PCR a partir de material fecal, tais como (1) purificação convencional ou densidade gradientes seguidos de extração de DNA; (2) separação física de oocistos de material fecal por tecnologia magnética ou triagem de células; e (3) extração direta de fezes diluídas ou pastilhas de fezes lavadas. Além de realização de cultura de fezes para crescimento de alguns agentes (FOSTER et al., 2004; HOSEIN et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi determinar a ocorrência e fatores de risco dos principais agentes infecciosos associados à diarreia e investigar a presença de *Enterocytozoon bieneusi* em gatos domiciliados de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

3.2 Objetivos Específicos do primeiro capítulo

- Determinar a frequência dos principais agentes infecciosos associados à diarreia em gatos pela técnica de Faust;
- Determinar a frequência dos principais agentes infecciosos associados à diarreia em gatos pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR), tais como *Cryptosporidium* spp., *G. intestinalis, T. foetus*, *T. gondii* e *Parvovírus* spp.;
- Avaliar a associação dos agentes com fatores clínicos e epidemiológicos observadas nos animais estudados;

3.3 Objetivos Específicos do segundo capítulo

- Determinar a frequência de *E. bieneusi* em gatos domiciliados do Brasil;

4. REFERÊNCIAS

ANJOS, D.S.; BABO-TERRA, V.J.; BORGES, F.A. Giardíase felina – uma zoonose? **Acta Veterinaria Brasilica,** v.7, n.2, p.81-90, 2013.

BATT, R. Diagnóstico laboratorial da doença intestinal em cães e gatos. **Veterinary Focus,** v.19, p.10-19, 2009.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998. 2072p.

BOWMAN, D.D. **Georgis-Parasitologia Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 432p.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M. Giardia. In: XIAO, L.; FENG, Y.; RYAN, U. **Biology of Foodborne Parasites**. CRC Press, 2015. Cap. 10, p. 175-193.

CARLETON, R.E.; TOLBERT, M.K. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminthes in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.4, p.319-326, 2004.

CHANDER, E.A.; GASKELL, C.J; GASKELL, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 590p.

COELHO, W. M. D. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v.18, n. 2, p. 46-49, 2009.

COOK, A.K. Feline Infectious Diarrhea. **Topics in Companion Animal Medicine**. Texas: Elsevier Inc. v. 23, p.169-176, 2008.

CURRENT, W.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.325–358, 1991.

DALL´AGNOL, L.P.; OTTO, M.A.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S.G. Parasitos gastrintestinais em gatos naturalmente infectados no município de santa maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.3, p.181-184, 2010.

DANIELS, J.B. Molecular Diagnostics for Infectious Disease in Small Animal Medicine: An Overview from the Laboratory. **Veterinary Clinics Small Animal,** p.1-12, 2013.

DOSSIN, O. Diarreia crônica em gatos. **Veterinary Focus**, v.19, n.1, p.2-9, 2009.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Extra-intestinalstages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, n.1, p.89-92, 1972.

DUBEY, J.P.. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2nd ed. 2010. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 2256p.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J.; WALKERN, J.H.A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts an helminth eggs in feces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 2, p. 169-183, 1938.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium* transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.1, p.12-13, 2000.

FAYER, R.; SANTIN, M.D**. Epidemiology of Microsporidia in humaninfections**. In: WEISS, L., BECNEL, J.J. (Eds.), Microsporidia: Pathogens of Oportunity. John Wiley & Sons, Inc., p. 135–164, 2014.

FOSTER, D.M.; GOOKIN, J.L.; POORE M.F. Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. **Scientific Reports**, v.225, n.6, p.888-892, 2004.

FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J. ; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M. Freqüência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1338-1340, 2007.

GALVÃO, A. L. B.; ORTIZ, E. G.; FERREIRA, G. S.; VASCONCELLOS, A.L.; Vieira, M.C.; Bresciani, K.D.S. Importância da criptosporidiose como zoonose**. Archives of Veterinary Science** v.17, n.2, p.18-28, 2012

GHOSH, S.; DEBNATH, A.; SIL, A.S.; CHATTOPADHYAY, D.J.P. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p. 181–189, 2000

GIACOMELLI, M; FOLLADOR, N.; COPPOLA, L.M.; MARTINI, M.; PICCIRILLO, A. Survey of *Campylobacter* spp. in owned and unowned dogs and cats in Northern Italy. **The Veterinary Journal**, v.204, p.333–337, 2015.

GIZZI, A.B.R.; OLIVEIRA, S.T.; LEUTENEGGER, C.M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D. A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **Bio Medicine Central Veterinary Research,** p.1-8, 2014.

GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic Reviews**, v.3, p.230-250, 1981.

GOOKIN, J.L.; BERKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERD, E.B.; EVY, M.G. Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 40, p. 4126-4130, 2002.

GREENCE, C.E.; ADDIE, D. Feline parvoviral infections, in Greene CE (ed): **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, ed 3. St Louis, Saunders Elsevier. 2006, p 78-86.

HAAS, D.J; TORRES, A.C.D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária,** v. 14, n. 26, p.1-15, 2016.

HOFFMANN, R.P. **Exame parasitológico de fezes. Diagnóstico de parasitismo veterinário.** Porto Alegre: Sulina, 1987. 120p.

HOLUBOVÁA, N.; SAKA, B.; HORČIČKOVÁA, M.; HLÁSKOVÁA, L.; KVĚTOŇOVÁA, D.; MENCHACAC, S.; MCEVOYD, J.; KVÁČ, M..*Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitol Research**. v. 115, n.6, p. 2243–2251, 2016.

HOSEIN, A.; KRUTH, A.S.; PEARL, D.L.; RICHARDSON, D.; MAGGS, J.C.; PEACH H.A.; PEREGRINE, A.S. Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. **Journal of Feline Medicine and Surgery**; v.15,p. 706-711, 2013.

IMMERSEEL, F.V.; PASMANS, F.; BUCK, J.; RYCHLIK, I.; HRADECKA, H.; COLLARD, J.; WILDEMAUWE, C.; HEYNDRICKX, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Cats as a Risk for Transmission of Antimicrobial Drug–resistant *Salmonella.* **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p. 2169-2174, 2004.

JAMSHIDI, S.H.; TABRIZI, A.S., BAHRAMI, M., MOMTAZ, H.,. Microsporidia in household dogs and cats in iran; a zoonotic concern. **Veterinary. Parasitology**, v.185, p.121– 123, 2012.

LAPPIN, M.R. Update on the Diagnosis and Management of *Isospora* spp Infections in Dogs and Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**. v.25, p. 133-135, 2010.

LOSS, Z.G. **Cistoisosporose felina**. 1991, 123p. Tese (Doutorado em medicina veterinária- Parasitologia veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

LUCIO-FORSTER, A.; GRIFFITHS, J.K.; CAMA, V. A., XIAO, L.; BOWMAN D. D. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v.26, p.174-179, 2010.

MATHIS, A., BREITENMOSER, A.C., DEPLAZES, P. Detection of new *enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. **Parasitologia**, v.6, p.189-193, 1999.

McORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A. R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods,** v.50, n. 2, p.131 – 139, 2002.

MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G.; FANNING, S.; LUCEY, B., MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MEGRAUD, F.; MILLAR, B.C.; O'MAHONY, R.; Lisa O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research** v.36, p.351–382, 2005.

MUNDIM, T.C.D.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.D.; Rodrigues, D.C.; Cury, M.C. Freqüência de helmintos em gatos de Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v.56, n.4, p. 562-563, 2004.

NAVARRO IT, VIDOTTO O, SILVA ACB, MISTUKA R, JANKEVICIUS JV, SHIDA PN. Comportamento imunológico e antigênico de cinco amostras de *Toxoplasma gondii* inoculadas em gatos. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.453-459, 1998.

NELSON, R.W. & COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4ª edição. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro. 2010, 1468p.

NEVES, D.P. et al. Parasitologia Humana - 11°ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NORSWORTHY, G.D; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S.F.; TILLEY, L. P. **O paciente felino**. 3ed. São Paulo: Roca, 2009, 801p.

PARIS, J.K.; WILLS, S.; BALZER, H.; SHAW, D.J.; MOORE, GUNN-MOORE, D.A. Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. **Bio Medicine Central Veterinary Research.** p.1-11, 2013.

PAYNE, P.A.; ARTZER, M. The biology and control of Giardia spp. And Tritrichomonas foetus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.39, p.993-1007, 2009.

PEREIRA,C.R.A.; FERREIRA, A.P. Ocorrência e fatores de risco da criptosporidiose em felinos de companhia de idosos. **Revista Brasileira de Geriatria Gerontologia**, v.15, n.4, p.681-691, 2012.

QUEIROZ, M.L.; CHIEFFI, P.P.S. Larva migrans visceral e *Toxocara canis*. **Arquivo Médico dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v.50, n.3; p.117-120, 2005.

RIBEIRO, V. M. **Controle de helmintos de cães e gatos**. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official e *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305- 313, 2016.

SAAD, F.M.O.B.; FRANÇA, J. Alimentação natural para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.52-59, 2010.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J., HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B., ERLICH, H.A.Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTIN, M., FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Research Veterinary Science,** v.90, p.363–371, 2011.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A; ELLERBROEK L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, p.1-13, 2012.

SCORZA, A.V.; LAPPIN, M. R.: Gastrointestinal protozoal infections. In August JR, editor: **Consultations in feline internal medicine,** 6 ed, St Louis, 2010, Saunders Elsevier, p. 201.

SERRA, C.M.B.; UCHÔA, C.M.A.; COIMBRA, R.A. Exame parasitológico de fezes de gatos (Felis catus domesticus) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. Revista da Sociedade **Brasileira de Medicina Tropical,** v.36, n.3, p.331-334, 2003.

SHERDING, R.; JOHSON, S. Doenças Intestinais. In: BIRCGARD, Stephen, J. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Roca. 2008, cap. 69, p.719-756.

SMITH, H.V., CACCIO, S.M., COOK N., NICHOLS R.A. & TAIT A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology,** v.149, p.29-40, 2007.

TAMS, T.R. Gastroenterologia de pequenos animais. 1 ed. São Paulo: Roca, 2005, 472p.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O´HANDLEY, R. The public health ad clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Journal Veterinary**, v. 177, p. 18-25, 2008.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197-203, 1998.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methodos to isolate Crysptosporidium DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 37-42, 2001.

WEESE, J.S. Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. **Vet Clin Small Anim**, v.41, p.287–309, 2011.

WHYTE, L. A.; JENKINS, H. R. Pathophysiology of diarrhoea. **Paediatrics and child Health**. v. 22, p. 443-447, 2012.

WIDMER, G. Genetic Heterogeneity and PCR Detection of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v.40, p. 224-239, 1998.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, v.8, n.3, p.375-376, 1921.

YAO, C.; KÖSTER.L. S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research** v. 45, p. 1-16, 2015.

ZAHEDI, A.; DURMIC, Z.; GOFTON, A.W.; KUEH, S.; AUSTEN, J., LAWSON, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiiae) from the guinea pig (Cavia porcellus). **Veterinay Parasitology**, p.1-32, 2017.

ZAHEDI, A., PAPARINI, A., JIAN, F., ROBERTSON, I., & RYAN, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.5,n.1,p.88-109.

5. CAPÍTULO 1

Artigo normatizado de acordo com o periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária: (http://cbpv.org.br/rbpv/normas/rbpv_v24n1_normas_PT.pdf)

Ocorrência de agentes infecciosos em gatos com diarreia provenientes de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

Occurrence of infectious agents in cats with diarrhea from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Jamile Batista Faria Prado[1]; Carlos Alberto Ramos do Nascimento[2]; Verônica Jorge Babo Terra[2]

[1]Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil
[2]Professor Adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo:
A diarreia é um problema rotineiro na clínica médica de felinos, tendo a origem infecciosa como uma das principais causas. Objetivou-se neste estudo identificar a ocorrência e os fatores de risco de agentes infecciosos associados à diarreia em gatos domiciliados de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Setenta amostras de fezes diarreicas de gatos domiciliados foram coletadas, de setembro de 2016 a maio de 2017, e processadas nos laboratórios de Doenças Parasitárias e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, utilizando o método de Faust e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), respectivamente, e posterior sequenciamento dos produtos positivos. O parasitismo por *Ancylostoma* spp. foi identificado em 17% dos gatos amostrados. Os protozoários foram os agentes infecciosos de maior frequência, representados por *Cystoisospora* spp. (28,6%) e *Giardia* spp. (21,4%) e *Cryptosporidium felis* (6,7%). Foi possível identificar *Parvovírus* spp. em 8,3% dos animais.

Dentre os fatores de risco avaliados, gatos que não possuíam acesso à rua e com diarreia crônica estavam significativamente associados à presença de *Giardia intestinalis*. Animais positivos para *Parvovirus* sp. apresentaram alta frequência de defecação. A PCR possibilitou diagnosticar maior número de animais, pela detecção de agentes patogênicos não identificados pela técnica de Faust. Além disso, os resultados mostraram que os gatos domiciliados de Campo Grande –MS também são capazes de dispersar agentes patogênicos no ambiente.

Palavras chave: Felinos, Fezes, PCR, Faust

Introdução

A diarreia é um problema rotineiro na clínica médica de felinos, sobretudo as de origem infecciosa (COOK, 2008; DOSSIN, 2009). Identificar os agentes patogênicos gastrointestinais nos gatos é muito importante, não somente devido aos danos à saúde do hospedeiro, mas também pelo potencial zoonótico que algumas espécies possuem (RAGOZO et al., 2012). Entretanto, chegar ao diagnóstico definitivo, principalmente das diarreias crônicas e intermitentes, é muitas vezes frustrante e difícil na prática clínica devido à grande variedade de patógenos e ausência de sinais clínicos específicos (TAMS, 2005; COOK, 2008).

Dentre os diversos parasitos gastrointestinais, os protozoários apresentam grande importância devido a patogenicidade e elevada prevalência em animais domésticos (DALL´AGNOL et al., 2010). *G. intestinalis, Cystoisospora* spp. e *Cryptosporidium* spp. são exemplos de protozoários que possuem distribuição mundial e são frequentemente observados em fezes de gatos, sendo que algumas espécies de *Cryptosporidium* spp. e cepas de *G. intestinalis* também podem infectar o homem (THOMPSON et al., 2008; LAPPIN, 2010; ANJOS et al., 2013; LUCIO-FOSTER, 2010). Os sinais clínicos dessas protozooses são em geral inespecíficos, associados aos quadros de diarreia, principalmente crônica, além de anorexia, perda de peso, febre, desidratação e fraqueza (THOMPSON et al.; 2008; DOSSIN, 2009; NORSWORTHY, 2009).

Outro protozoário como *Tritrichomonas foetus,* conhecido por ocasionar problemas reprodutivos em bovinos, foi recentemente identificado como causador de diarreias em gatos,

principalmente os que vivem em alta densidade populacional (FOSTER et al., 2004; GOOKIN et al. 2002; COOK, 2008; HOSEIN et al., 2013). Já *Toxoplasma gondii* tem seus oocistos eliminados junto com as fezes do hospedeiro. Apesar de rara, diarreia no momento da eliminação dos oocistos pode acontecer, conforme observado por Navarro et al. (1998).

É importante ressaltar as viroses, principalmente aquela causada por parvovírus felino, como responsáveis por diarreias agudas, observadas principalmente em filhotes que não vacinados, levando a quadros severos de desidratação (COOK, 2008; NORSWORTHY et al., 2009).

Quando se trata de agentes como *T. foetus, T. gondii* e *Cryptosporidium* spp. as técnicas coproparasitológicas (Willis, Faust e exame direto), rotineiramente utilizadas em laboratórios de parasitologia são em geral, insuficientes para descartar a infecção, dada a dificuldade de visualização dos agentes. Além disso, não permitem diagnosticar outros agentes como vírus e bactérias que necessitam de técnicas especiais para seu diagnóstico como isolamento viral e cultura microbiológica, respectivamente. Dessa maneira, as técnicas de biologia molecular, notadamente a PCR e sequenciamento de DNA, são bastante apropriadas para a identificação destes agentes de forma mais precisa. Diante disso, o presente trabalho objetivou identificar ocorrência de patógenos e os fatores de risco associados a quadros de diarreia em gatos domiciliados no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Material e Métodos

Amostras

Após aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo número 787/2016), foram coletadas amostras fecais de 70 gatos com diarreia, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal por meio de sonda estéril ou do ambiente logo após a defecação, sendo uma única coleta por animal. Todos os animais eram provenientes de proprietários residentes no município de Campo Grande- MS. As amostras coletadas foram armazenadas em temperatura de refrigeração (ou 4 ºC) até o momento dos exames.

Informações acerca de aspectos epidemiológicos foram avaliadas por meio de anamnese (Anexo 1). Para os fatores de risco associados à presença dos agentes, considerou-

se: sexo; idade; acesso à rua; e presença de contactantes felinos. Para avaliar a associação entre as características clínicas e a presença dos agentes, foram considerados: a consistência das fezes (pastosa ou líquida); o início dos sinais gastrointestinais (quadro agudo: duas semanas; crônico: igual ou superior a duas semanas); frequência de defecação (normal: até duas vezes; elevada: superior a duas vezes por dia); e a presença de outros sinais sistêmicos obtidos por meio de exame clínico, como por exemplo vômito, desidratação, prostração, emagrecimento e hipertermia.

Técnica parasitológica de Faust

As amostras foram submetidas à técnica de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (FAUST et al., 1938), processadas em no máximo 24 horas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os parasitos foram identificados de acordo com os caracteres morfológicos de seus ovos, cistos e oocistos, segundo Sloss et al. (1999).

Extração de DNA

Uma alíquota de fezes de cada animal foi acondicionada em microtubos de polipropileno contendo 200 µL de solução salina (NaCl 0,9%) e estocada a -20°C, até o processamento pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no Laboratório de Biologia Molecular da FAMEZ**.** Para a extração de DNA, utilizou-se o protocolo descrito por Araújo et al. (2009). Inicialmente, 300 µL das suspensões fecais armazenadas em microtubos foram centrifugadas (10000 xg por 10 minutos). Após descarte do sobrenadante o sedimento foi suspenso em 500µl de SDS 20% (Dodecil sulfato de sódio), acrescido de 10 µL de Proteinase K (20 mg/mL). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e novamente agitado em vórtex, quando então foi adicionado 300 µL de solução de precipitação de proteínas (Acetato de potássio 5M, Ácido acético glacial 11%). Os microtubos foram centrifugados (10000 xg por 10 minutos) e o sobrenadante transferido para um novo microtubo com capacidade para 1.5 mL. Foi adicionado então 1 mL de etanol 100% para precipitação do DNA. Após outra etapa de centrifugação (10000 xg por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70%. Após mais uma etapa de centrifugação (10000 xg por 2 min), o sedimento foi submetido a secagem em temperatura ambiente. Após este período foram adicionados 100 µL de água ultrapura (*nuclease free*) para diluição do DNA.

A quantidade e a integridade das amostras de DNA extraídas foram avaliadas por meio de espectrofotometria (BioPhotometer plus; Eppendorf ®) e eletroforese em gel de agarose (1%), respectivamente. Somente foram utilizadas as amostras que apresentaram concentração igual ou superior a 25 ng/ µL, razão 260/280nm igual ou superior a 1,75 e visualização de DNA genômico em eletroforese.

Reação em Cadeia da Polimerase e sequenciamento

As reações de PCR foram realizadas com iniciadores e parâmetros específicos para cada agente (Tabela 1). Em cada reação foram utilizados controles negativo (água ultrapura) e positivos.

Tabela 1. Agentes e iniciadores utilizados para identificação de patógenos no presente estudo.

Agente	*Primers*	Referência
Giardia spp	GDHE F 5'-TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT-3' GDHI R 5'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C-3' GDHI F 5'-CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG-3' GDHI R 5'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C-3'	Read et al. (2004)
Cryptosporidium spp.	CryptoF1 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' CryptoR1 5'-CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA-3' CryptoF2 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' CryptoR2 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'	Xião et al. (1999)
T. foetus	TRF 3 5'-CGG GTC TTC CTA TAT GAG ACA GAA CC-3' TRF 4 5'-CCT GCC GTT GGA TCA GTT TCG TTA A-3'	Felleisen et al. (1998)
T. gondii	AF146527F 5'-CTG CAG GGA GGA AGA CGA AAG TT-3' AF146527R 5'-CTG CAG ACA CAG TGC ATC TGG AT-3'	Homan et al. (2000)
Parvovirus sp.	CPV F 5'-CAG GAA GAT ATC CAG AAG GA-3' CPV R 5'-GGT GCT AGT TGA TAT GTA ATA AAC A-3'	Buonavoglia et al.,(2001)

Para detecção de *Giardia intestinalis* foi utilizada a *semi-nested* PCR descrita por Read et al. (2004). Foi realizado *nested* PCR para amplificação de 826 a 864 pares de base da subunidade 18S do rRNA de *Cryptosporidium* spp., como descrito por Xiao et al. (1999). Para produzir um fragmento de aproximadamente 432 pares de bases. Para *Tritrichomonas foetus* foi utilizada a PCR descrita por Felleisen et al. (1998), para amplificação de 347 pares de bases da subunidade 18S do rRNA. Para investigação de *Toxoplasma gondii* foi utilizada a reação de PCR descrita por Homan et al. (2000), que delimita um fragmento de 529 pares de

base em uma região repetitiva. E, por fim, foi utilizada a reação de PCR descrita por Buonavoglia et al. (2001) para detecção de parvovírus.

Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose (2%), corado com 1 µL de GelRed (Biotium). Os produtos das reações foram purificados utilizando 20 µL da reação de PCR com 2 µL de Clean Sweep PCR Purification (Appliedbiosystems), com 30 minutos de termociclagem; em seguida duas alíquotas foram feitas, acrescentando em cada tubo 0,5 µL de cada primer utilizado, *forward* e *reverse*. Após, as amostras foram secas e enviadas ao laboratório ACTGene para o sequenciamento que segue o método de Sanger (SANGER et al., 1977). A identificação das espécies foi realizada com o auxílio do programa BLASTn (disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, por meio da busca por homologia com sequências de DNA depositadas no GenBank-NCBI.

Estatística

Estática descritiva foi utilizada para verificar a frequência de cada patógeno. A associação entre as variáveis clínicas/epidemiológicas e a presença dos agentes identificados foi avaliada por meio do teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5%, utilizando o programa Biostat 5.0.

Resultados e Discussão

A frequência geral de infecção por parasitas gastrointestinais (Tabela 2) detectados pela técnica parasitológica de Faust foi de 51,4% (36/70). Tal ocorrência é compatível com o observado em vários estudos realizados em diferentes regiões do Brasil, os quais apresentam prevalências que variaram de 31,5% a 100%, divergindo somente no tipo de técnica(s) parasitológica(s) escolhida(s) (SERRA et al. 2003; TESSEROLI et al., 2005; FUNADA et al., 2007; COELHO et al., 2009; DALL'AGNOL et al., 2010; PIVOTO et al., 2013; PEREIRA et al., 2017).

As variações entre ocorrências de diferentes agentes infecciosos estão relacionadas às diferentes condições climáticas, socioeconômicas e populações de gatos estudadas, como já apontado por Mircean et al. (2010). No presente estudo, assume-se que a superioridade na frequência, pode ser atribuída que alguns gatos domiciliados possuíam acesso à rua e também

que muitos gatos provinham de abrigos ou proprietários com aglomeração de animais. Condições climáticas e socioeconômicas, apesar de não avaliadas no presente estudo, também podem ter favorecido na dispersão e propagação dos parasitos.

Dentre as 70 amostras de fezes encaminhadas para extração de DNA, em 60 foi possível obter DNA em quantidade e qualidade suficientes para pesquisa molecular. Dessas, em 16,66% (10/60) observou-se amplificação para um ou mais agentes (Tabela 2). Algumas amostras mesmo apresentando na espectrofotometria, quantidades elevadas de DNA, o mesmo não foi observado após eletroforese, indicando uma possível degradação do material genético. Além da dificuldade em obter DNA viável a partir de amostras de fezes, tem sido observado em alguns estudos que determinadas amostras, tais como fezes e solo, podem conter inibidores de amplificação (polissacarídeos, íons minerais e compostos húmicos), além de uma microbiota diversificada, cujo DNA é frequentemente extraído concomitantemente com o DNA dos patógenos, podendo reduzir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD & WANG, 2001).

Tabela 2: Tipo de infecção e ocorrência dos agentes patogênicos em amostras fecais diarreicas de gatos, identificados pelas Técnicas de Faust (n=70) e PCR/sequenciamento (n=60), no período de setembro de 2016 a maio de 2017, em Campo Grande- MS.

Agentes	Técnica de Faust (%)	PCR/sequenciamento (%)
Cystoisospora spp.	28,57 (20/70)	*
Giardia intestinalis.	21,43 (15/70)	1,66 (1/60)
Ancylostoma spp.	17,14 (12/70	*
Cryptosporidium felis	**	6,66 (4/60)
Parvovirus spp.	**	8,33 (5/60)
Toxoplasma/Hammondia spp.	1,42 (1/70)	0

* não foi avaliado por esta técnica; **não é possível identificação por esta técnica

Co-infecções por dois ou três agentes foram observadas em 33,3% das amostras analisadas (Tabela 3), sendo *Cystoisospora* spp. e *Ancylostoma* spp. os mais frequentes. A associação entre *Ancylostoma* spp. e *Cystoisospora* spp. corrobora as observações de Coelho et al. (2009) e Serra et al. (2003), que também observaram como mais frequentes a mesma associação parasitária em gatos de Andradina-SP e Região Metropolitana do Rio de Janeiro-RJ, respectivamente.

Tabela 3. Co-infecções parasitárias encontrados em amostras fecais de gatos através do exame parasitológico de Faust e PCR, no período de setembro de 2016 a maio de 2017, em Campo Grande- MS.

Associação de parasitos	Frequência (%)
Cystoisospora spp. + *Ancylostoma* spp.	11,90
Cystoisospora spp. + *Giardia intestinalis*	4,76
Giardia intestinalis. + *Ancylostoma* spp.	2,38
Giardia intestinalis. + *Toxoplasma/Hammondia*	2,38
Cryptosporidium felis+ *Cystoisospora* spp.	2,38
Cryptosporidium felis +*Parvovirus* spp.	2,38
Cryptosporidium felis+*Cystoisospora* spp.+ *Ancylostoma* spp	2,38
Parvovirus spp.+*Cystoisospora spp.*+ *Ancylostoma spp*	2,38
Parvovirus spp.+*Cystoisospora spp.*+ *Giardia intestinalis*	2,38

Dentre os diferentes parasitos identificados nesse estudo, os protozoários *Cystoisospora* spp., *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium felis* foram responsáveis pelo maior número de gatos com diarreia. Além disso, foram identificados cistos de *Toxoplasma/Hammondia* spp. em um animal, semelhante ao encontrado por Funada et al. (2007) em dois gatos provenientes de São Paulo-SP. Entretanto, não foi confirmado T. *gondii* pela PCR no presente estudo, o que sugere que o cisto poderia ser de *Hammondia* spp. Embora tenha sido observado a ocorrência de *Ancylostoma* spp. em 17,1% das amostras, a maioria apresentava co-infecção com algum protozoário, podendo essa ser a causa do agravamento do quadro clínico de diarreia nos gatos.

Diversos estudos têm observado maiores frequências de protozoários em relação aos helmintos em fezes de gatos (FUNADA et al., 2007; PALMER et al., 2008; DALL'AGNOL et al., 2010; MIRCEAN et al., 2010; FERREIRA et al. 2013). Palmer et al. (2008) enfatizam que as infecções por protozoários são mais comuns do que por helmintos, devido a maioria dos animais receberem tratamento anti-helmíntico de forma profilática e periódica.

O protozoário *T. foetus* não foi identificado em nenhuma das amostras analisadas por PCR. Entretanto, a não amplificação desse agente não significa ausência do parasita. Hosein et al. (2013) destacam que a eliminação intermitente do parasito durante os episódios de diarreia dificultando a identificação em uma única colheita de fezes, podendo resultar em

falsos-negativos. Thurmond & Johnson (2004) destacam que o ideal seria realizar a coleta seriada de no mínimo três amostras intercaladas. No entanto, no presente estudo essas coletas não foram realizadas.

O protozoário *Cystoisospora* spp., diagnosticado pela da técnica de Faust, foi o mais frequente (28,57%) no presente estudo. Este resultado foi superior aos encontrados por Tesserolli et al. (2005) em Curitiba-PR e Ferreira et al. (2013) em Londrina-PR, que apesar de encontrarem o mesmo agente como o mais frequente, observaram frequência de 10% e 11,6%, respectivamente. Esses resultados confirmam que o parasito está presente nas fezes de gatos de Campo Grande-MS e fatores climáticos ou de manejo dos animais podem estar favorecendo a propagação do agente.

Entretanto, ao analisar as associações entre infecções e fatores clínico/epidemiológicos, não houve associação significativa relacionados à infecção por *Cystoisospora* spp., corroborando as observações de outros pesquisadores que consideram esse agente pouco patogênico (SHAH, 1972). Estudos experimentais indicam que *C.felis* não é patogênico para gatos com mais de um mês de idade, sugerindo que tais animais desenvolvam imunidade à esses coccídeos ao longo da vida (Lindsay e Blagburn, 1994). Loss (1991) concluiu em seu experimento que animais jovens são mais sensíveis a cistoisosporose, e os fatores estressantes favorecem a eliminação dos oocistos nas fezes, muitas vezes acompanhada de quadro clínico grave.

No Brasil, a prevalência de *G. intestinalis* em gatos é bastante variada (4,2% a 34,5%) (SERRA et al., 2003; FUNADA et al., 2007; BRINKER et al. 2009; COELHO et al., 2009; DALL'AGNOL et al., 2010; PIVOTO et al., 2013). No presente estudo *G. intestinalis* foi o segundo parasita com maior frequência (21,42%) pelo teste de Faust, mostrando resultados semelhantes aos de Huber et al. (2002) que avaliaram amostras fecais de gatos domiciliados e de abrigos da cidade de Mangaratiba-Rio de Janeiro, e observaram frequência de 21,43% (6/28) em gatos de abrigos e 45% (9/20) de *G. intestinalis* em gatos domiciliados.

Entretanto, das 15 amostras positivas apenas uma apresentou amplificação na PCR. Esse fato pode ser explicado pela baixa eficiência na recuperação dos cistos presentes na amostra. Gosh et al. (2000), destaca que amplificações negativas na reação de PCR para *Giardia* spp. pode ser devido à presença de substâncias inibitórias nas fezes, tais como bilirrubina, urobilinogênio e sais biliares, que reduziram a eficiência de amplificação..

Ao analisar alguns fatores associados à infecção por *Giardia* em gatos (Tabela 4) no município de Campo Grande, MS, observou-se que os gatos que não tinham acesso à rua

apresentaram frequência de infecção significativamente superior (p= 0,0147). Este resultado evidencia que os animais não precisam ter acesso ao meio externo para se infectarem por esse patógeno. É possível que esses animais tenham se infectado por meio da ingestão de água contaminada e pelo contato próximo com humanos infectados (ETTINGER & FELDMAN 2004; NORSWORTHY et al., 2009). Existem fortes evidências de que o homem possa contaminar os animais e vice-versa. De acordo com Bowaman (2010), cerca de 7% da população humana mundial abriga *Giardia* spp. no intestino delgado. Entretanto, nesse estudo, os contactantes humanos dos gatos não foram avaliados quanto à infecção de *Giardia*.

Em relação aos outros fatores analisados, verificou-se também que a eliminação de cistos de *Giardia* spp. está mais associada a quadros crônicos de infecção (p=0,0436), uma vez que a presença do parasita foi frequente em animais que apresentavam diarreia crônica, há mais de 2 semanas. Dossin (2009) considera protozoários, como por exemplo *Giardia* spp., uma das causas mais frequentes de diarreia crônica em gatos, uma vez que esses não são considerados nos protocolos de vermifugação de rotina. A infecção pode perdurar por um longo período de tempo, possivelmente pela reinfecção por cistos presentes em pelos, e ao hábito que os gatos têm de autolimpeza (BRINKER et al., 2009).

Tabela 4. Fatores de risco associados à presença de *Giardia intestinalis* em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS

Fator de risco	**Categoria**	**Positivo (n)**	**Negativo (n)**	***p-value****
Sexo	Macho	12	30	0,0851
	Fêmea	3	25	
Idade	≤ 1 ano	13	35	0,0780
	>1 ano	2	20	
Acesso à rua	Sim	0	17	0,0087
	Não	15	38	
Contactantes	<4	6	25	0,4694
	≥4	9	30	
Consistência das fezes	Pastosas	11	40	1
	Líquidas	4	15	
Início dos sinais	Agudo	3	27	0,0397
	Crônico	12	28	
Frequência	Normal	9	25	0,2398
	Elevada	6	30	
Alterações sistêmicas	Sem alterações	12	42	0,5345
	Com alterações	3	13	

* teste exato de Fisher com 5% de significância

O protozoário *Cryptospordium felis* foi detectado em 6,6% (4/60) das amostras analisadas por *nested* PCR/sequenciamento (Figura 4). Tal frequência encontrada no presente estudo corrobora a prevalência relatada para esse agente em populações de gatos do Brasil, a qual pode variar de 1,45% a 11,3% (RAGOZO et al., 2002; FUNADA et al., 2007; COELHO et al, 2009; PIVOTO et al., 2013). Dentre os fatores clínicos e epidemiológicos avaliados (Tabela 4), o sexo feminino mostrou ter associação significativa (p=0,0259) com a infecção pelo protozoário.

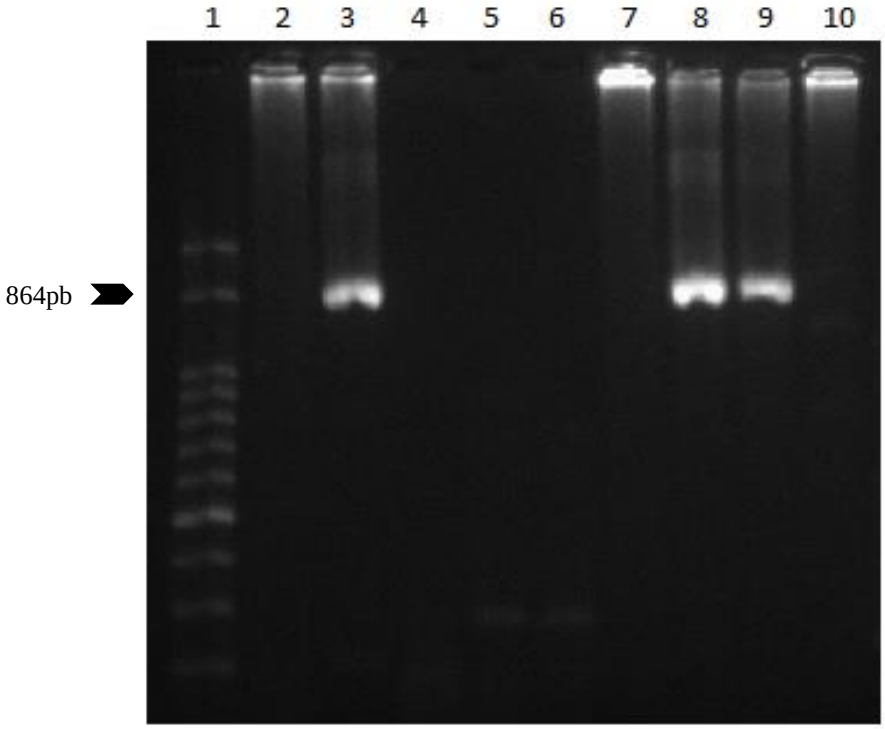

Figura 4- Gel de agarose 2%, corado com Gel Red, mostrando produtos de *nested* PCR de aproximadamente 864 pb de DNA de *Criptosporidium felis*, em 3, 8 e 9. (Fonte: Arquivo pessoal)

Excluindo o fato de que todos os animais do estudo apresentavam sinal clínico de diarreia, os demais fatores avaliados não mostraram associação significativa com a presença de *Cryptosporidium felis.* Tal observação está de acordo com citações de Dall'Agnol et al. (2010) que observaram ser relativamente comum a presença de infecções por protozoários em gatos saudáveis e assintomáticos, e ainda ressaltam que filhotes parecem ser mais suscetíveis ao parasitismo, provavelmente devido à imaturidade do sistema imune. No estudo de Kostopoulou et al. (2017), na Grécia, dos 30.9% de gatos com diarreia, 32.9% estavam infectados com pelo menos um parasita e não foram encontradas associações significativas

entre a infecção parasitária e os fatores de risco, ou mesmo entre detecção do parasita e diarreia.

Tabela 5. Fatores de risco associados à presença de *Cryptospordium felis* em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS

Fator de risco	**Categoria**	**Positivo (n)**	**Negativo (n)**	***p-value****
Sexo	Macho	0	35	0,0259
	Fêmea	4	21	
Idade	≤ 1 ano	3	40	0,5556
	>1 ano	1	16	
Acesso à rua	Sim	2	12	0,2245
	Não	2	44	
Contactantes	<4	1	27	0,6155
	≥4	3	29	
Consistência das fezes	Pastosas	3	41	0,7129
	Líquidas	1	15	
Início dos sinais	Agudo	1	26	0,6199
	Crônico	3	30	
Frequência	Normal	3	25	0,2570
	Elevada	1	31	
Alterações sistêmicas	Sem alterações	4	43	
	Com alterações	0	13	0,3658

* teste exato de Fisher com 5% de significância

A frequência de infecção por parvovírus (8,33%) observada no presente estudo, foi superior aos achados de Sabshin et al. (2012), que encontraram frequência de 2% em amostras de fezes de 480 gatos na Florida-EUA. Visto que nenhum dos gatos era vacinado, tal achado demonstra a importância da vacinação dos mesmos, pois o parvovírus é altamente contagioso e letal, principalmente em filhotes (SABSHIN et al., 2012). Com relação aos fatores clínicos e epidemiológicos avaliados (Tabela 6), a elevada frequência de defecação mostrou associação significativa (p=0,0369) com a infecção por porvovírus, corroborando os achados de Cook (2008).

Acredita-se que os gatos são acometidos somente pelo vírus da panleucopenia felina, ou parvovírus felino. Entretanto, Clegg et al. (2012), em seu estudo que compara as espécies de parvovírus canino e felino, descrevem que os gatos podem portar o parvovírus canino de

forma assintomática, além de eliminá-lo por longos períodos, aumentando a possibilidade de gatos serem reservatórios importantes na manutenção da infecção tanto na população de cães como na de gatos. Diante disso, o sequenciamento das amostras positivas desse estudo seria de fundamental importância para esclarecer qual espécie está infectando os gatos de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Entretanto, as amostras enviadas ao sequenciamento foram insuficientes para determinar a espécie.

Tabela 6. Fatores de risco associados à presença de *Parvovírus* spp. em fezes de gatos com diarreia, no município de Campo Grande-MS

Fator de risco	**Categoria**	**Positivo (n)**	**Negativo (n)**	***p-value***
Sexo	Macho	2	33	0,6405
	Fêmea	3	22	
Idade	≤ 1 ano	2	41	0,1323
	>1 ano	3	14	
Acesso à rua	Sim	3	11	0,0778
	Não	2	44	
Contactantes	<4	2	27	0,5645
	≥4	3	29	
Consistência das fezes	Pastosas	2	42	0,1125
	Líquidas	3	13	
Início dos sinais	Agudo	3	24	0,4036
	Crônico	2	31	
Frequência	Normal	0	28	0,0369
	Elevada	5	27	
Alterações sistêmicas	Sem alterações	3	44	
	Com alterações	2	11	0,2943

* teste exato de Fisher com 5% de significância

Conclusões

No presente estudo, a técnica de diagnóstico molecular possibilitou a detecção agentes infecciosos não encontrados pelas técnicas usuias de rotina parasitológica, como por exemplo parvovírus. Além de permitir a identificação de espécies através do sequenciamento, como no caso de *Cryptosporium felis.*

A detecção de vários agentes patogênicos em fezes diarreicas de gatos deste estudo, muitos deles com grande importância em saúde pública, demonstra que não somente gatos

errantes, mas também gatos domiciliados podem constituir importantes fontes de infecção de agentes de caráter zoonótico para os seres humanos.

Referências Bibliográficas

Anjos DS, Babo-Terra VJ, Borges FA. Giardíase felina – uma zoonose? *Acta Vet Bras* 2013; 7(2): 81-90.

Araujo FR, Ramos CAN, Luiz HL, Peres IAHFS, Oliveira RHM, Souza IIF, Russi LS. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Embrapa Gado de Corte* 2009.

Bowman DD. *Georgis-Parasitologia Veterinária.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 432p

Brinker JC, Teixeira MC, Araújo de FA. Ocorrência de *Giardia* sp. em cães e gatos no município de Caxias do Sul, RS. *Rev FZVA* 2009; 16: 113-119.

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001; 82: 3021–3025.

Clegg SR, Coyne KP, Dawson S, Spibey N, Gaskell RM, Radford AD. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. Vet Microbiol 2012; 157: 78–85.

Cook AK. Feline Infectious Diarrhea. *Top Companion Anim Med* 2008; 23:169-176.

Coelho WMD, Amarante AFT, Soutello RVG, Meireles MV, Brescianatia KDS. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(2): 46-49.

Current W, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 325–358.

Dall´Agnol LP, Otto MA, Silva AS, Monteiro SG. Parasitos gastrintestinais em gatos naturalmente infectados no município de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Vet Bras* 2010; 4(3): 181-184.

Dossin O. Diarreia crônica em gatos. *Vet Focus* 2009; 19(1): 2-9.

Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de medicina interna veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Faust EC, D'Antoni JS, Odom V, Peres C, Sawitz W, Thomen LF et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts an helminth eggs in feces. I. preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 1938; 18(2): 169-183.

Felleisen RSJ, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B. Detection of Tritrichomonas foetus by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Microbiol* 1998; 36(2): 513-519.

Ferreira FP, Dias RCF, Martins TA, Constantino C, Pasquali AKS, Vidotto O et al. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina: Ciênc Agrár* 2013; 34(6): 3851-3858.

Foster DM, Gookin JL, Poore MF.,Stebbins. Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *Sci Rep* 2004 , 225(6): 888-892.

Funada MR, Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Gennari SM. Freqüência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2000; 59(5): 1338-1340.

Ghosh S, Debnath A, Sil A, De S, Chattopadhyay DJ, Das P. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 181–189.

Gookin JL, Berkenheuer AJ, Breitschwerd EB, Levy MG. Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foestus* in feline feces. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4126-4130.

Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J, Verschueren H. Identi®cation of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol 2000; 30: 69-75.

Hosein A, Kruth,AS, Pearl DL, Richardson D, Maggs JC, Peach HÁ, Peregrine AS. Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. *J Feline Med Surg* 2013;15: 706-711.

Huber F, Bomfim TCB, Gomes RS. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. *Rev Bras Parasitol Vet* 2002; 11(1): 7-12.

Lappin MR. Update on the Diagnosis and Management of *Isospora* spp Infections in Dogs and Cats. *Top Companion Anim Med* 2010; 25: 133-135.

Lindsay DS, Blagburn BL. Biology of mammalian *Isospora. Parasitol Today*, 1994; 10(6): 214-220.

Loss ZG. *Cistoisosporose felina* [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1991.

Lucio-Forster A, Griffiths, JK, Cama VA, XIao L, Bowman DD. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol* 2010; 26: 174-179.

Mircean V, Titilincu A, Vasile C. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Vet Parasitol* 2010; 171: 163–166.

Navarro IT, Vidotto O, Silva ACB, Mistuka R, Jankevicius JV, Shida PN et al. Comportamento imunológico e antigênico de cinco amostras de *Toxoplasma gondii* inoculadas em gatos. *Cien Rural* 1998; 28(3): 453-459.

Norsworthy GD, Crystal MA, Grace SF, Tilley LP. *O paciente felino.* São Paulo: Roca; 2009.

Palmer CS, Thompson RCA, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet Parasitol* 2008; 151: 181–190.

Pereira PF, Barbosa AS, Moura APP, Vasconcellos ML, Uchôa CMA 2; Bastos OM et al. Gastrointestinal parasites in stray and shelter cats in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2017; 1-6.

Pivoto FL, Lopes LFD, Vogel FSF, Botton AS, Sangioni LA. Ocorrência de parasitos gastrointestinais e fatores de risco de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, RS, Brasil. *Cienc Rural* 2013; 43(8): 1453-1458.

Ragozo AMA, Muradian V, Ramos e Silva J C, Caravieri R, Amajoner VR Magnabosco C et al. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2002**;** 39(5): 244-246.

Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol 2004; 4: 125–130.

Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *Sci Rep* 2012; 241(3): 331-337.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5463-5467.

Serra CMB, Uchôa CMA, Coimbra RA. Exame parasitológico de fezes de gatos (Felis catus domesticus) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3): 331-334.

Sloss MW, Zajac AM, Kemp RL. *Parasitologia Clinica Veterinária*. São Paulo: Manole Ltda; 1999.

Shah HL. The life cycle os *Isospora felis* Weyon, 1923, a coccidium of the cat. *Jl Protozool* 1972; 18: 3-7.

Tams TR. *Gastroenterologia de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2005.

Tesserolli, GL, Fayzano, L, Agottani, JVB. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em fezes de cães e gatos, Curitiba – PR. *Rev Acad* 2005; 3(4): 31-34.

Thompson RCA, Palmer CS, O´Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 2008; 177: 18-25.

Thurmond MC, Johnson WO. Effect of multiple sampling on diagnostic sensitivity. J *Vet Diagn Invest* 2004; 16: 233-236.

Ward LA, Wang Y. Rapid methodos to isolate Crysptosporidium DNA from frozen feces for PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 37-42.

Xião LA, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W et al. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3386-3391.

6. CAPÍTULO 2

Artigo normatizado de acordo com o periódico: Veterinary Parasitology (https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017/guide-for-authors)

ZOONOTIC *Enterocytozoon bieneusi* OCCURRENCE IN CATS FROM BRAZIL

Jamille Batista Faria Prado[a], Carlos Alberto Ramos do Nascimento[b], Vagner Ricardo da Silva Fiuza[c] , Veronica Jorge Babo Terra[b]

[a] *Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Av. Senador Filinto Muller 2443, Universitário, Campo Grande, MS, Brazil*

[b] *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Av. Senador Filinto Muller 2443, Universitário, Campo Grande, MS, Brazil*

[c] *Instituto de Biociências, UFMS, Cidade Universitária Universitário - Pioneiros, Campo Grande - MS, Brazil*

Highlights

- This is the first report of *E. bieneusi* in cats from Brazil
- *E. bieneusi* was detected in 3.3% household animals
- A zoonotic genotype (D) has been found
- *E. bieneusi* presence and diarrhea in cats could not be associated

Abstract: *Enterocytozoon bieneusi* is an opportunistic intestinal pathogen that infects humans and a wide variety of animals worldwide. The present study aimed to investigate the occurrence of *E. bieneusi* in a cat population from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Sixty fecal samples from diarrheic household cats were collected, submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequenced for molecular identification. *E. bieneusi* was detected in two samples (3.3%), both identified as genotype D. This genotype has already been reported in a wide variety of animals including humans and is considered as a zoonotic genotype. However, *E. bieneusi* presence and diarrhea in cats could not be correlated. Our findings present the first report of *E. bieneusi* in cats from Brazil, reinforcing the importance of this agent identification as a source of infection for animals and humans.

Key words: microsporidia, zoonosis, felines, diagnosis, PCR

1. Introduction

Microsporidia are obligate intracellular fungi pathogens. About 1,200 different species have already been described infecting a wide variety of invertebrate and vertebrate hosts including man (Santin and Fayer, 2011). However, only 17 species are known to be pathogenic to humans with *Enterocytozoon bieneusi* considered as the most common specie causing disease (Mathis et al., 2005; Fayer and Santin, 2014). *E. bieneusi* is an opportunistic pathogen, which mainly infects immunocompromised individuals who have CD4+ cell counts below 100 cels/mm3 (Lobo et al., 2002) causing clinical signs of chronic diarrhea associated with abdominal pain, fever and weight loss (Akinbo et al., 2012; Brazil et al., 2000). Transmission occurs via fecal-oral route, by ingestion of spores eliminated with feces from infected animals or humans or by ingestion of water and food contaminated with these spores (Santin and Fayer, 2011).

E. bieneusi was first identified in 1985 in enterocytes from a HIV+ human (Desportes et al., 1985). In animals, the first description occurred in 1996 in pig feces (Deplazes et al., 1996), and thereafter detected in feces and intestinal tissue of a wide variety of other animals (Mathis et al., 2005; Santin and Fayer, 2011). Information on *E. bieneusi* occurrence in cats is scarce; there are studies in Asian and European countries, as well as a single study in South America. Nearly all of these studies have identified zoonotic *E. bieneusi* genotypes, which includes cats as dispersing agents and potential source of infection for humans. Since there are no studies on *E. bieneusi* in cats from Brazil the objective of the present research was to investigate the occurrence of *E. bieneusi* in diarrheic household cats from the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, central-west Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Specimens

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Protocol number 787/2016).

Diarrheic fecal samples were cautiously collected from floor right after defecation from 60 household cats from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, from September 2016 to May 2017, with ages varying from 45 days to 17 years. A total of eight houses were visited, and collections were carried out in private clinics. All samples (approximately 8

grams each) were placed in clean recipients and immediately transported to the Molecular Biology Laboratory of Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) where they were stored in 1,5 mL polypropylene tubes with 500 μL of 0.9% sterile saline solution, and kept frozen at -20 °C until DNA extraction.

2.2 DNA extraction

Three hundred microliters of the fecal suspensions stored in microtubes were centrifuged (10,000 x *g* for 10 minutes). After discarding the supernatant the pellet was suspended in 500 μL of 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), and 10 μL of Proteinase K (20 mg/mL) were added. The suspension was homogenized in vortex and incubated at 65 °C for 10 minutes; then 400 μL of chloroform was added and vortexed again, and 300 μL of protein precipitation solution (5M potassium acetate, 11% glacial acetic acid) was added. The microtubes were centrifuged (10,000 x *g* for 10 minutes) and the supernatant transferred to a new 1.5 mL microtube. 1 ml of 100% ethanol was then added for DNA precipitation. After another centrifugation step (10,000 x *g* for 5 minutes), the supernatant was discarded and the pellet washed with 1 mL of 70% ethanol. The samples were centrifuged for 2 min (10,000 x *g*), and the pellet was subjected to drying at room temperature. After this period 100 μL of nuclease free water was added for DNA dilution. After analysis in spectrophotometer BioPhotometer Eppendorf, all samples had a concentration equal to or greater than 25 ng/μL and a ratio of 260/280nm equal to or greater than 1.75.

2.3 PCR and sequencing

A nested protocol was used for *E. bieneusi* molecular identification, as described by Buckholt et al. (2002). The primers used in the first PCR were EBITS3 (5 'GGT CAT AGG GAT GAA GAG 3') and EBITS4 (5 'TCG AGT TCT TTC GCG CTC 3'); whereas primers EBITS1 (5 'GCT CTG AAT ATC TAT GGC T 3 ') and EBITS2.4 (5' ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG 3 ') were used for the second reaction, amplifying a 392bp DNA fragment comprising part of the internal transcriber spacer (ITS) region of the *E. bieneusi* rRNA gene (Buckholt et al., 2002). Reactions were performed in a final volume of 25 μl containing 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 9), 0.2 mM dNTPs, 1 μM of each primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase. The thermocycling program of the first reaction was 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30s, annealing at 57 °C for 30s, and

extension at 72 ℃ for 40s, followed by a final extension at 72 ℃ for 10 min. The second reaction was similar to the first except for the annealing temperature (55 °C), and the number of PCR cycles (30 cycles). *E. bieneusi* positive controls obtained from cattle from a previous study carried out in Brazil (Fiuza et al., 2016), as well as negative controls (ultra-pure water) were included in all reactions.

Amplification products were visualized in agarose gel (2%) stained with GelRed (Biotium®) under ultraviolet light after gel electrophoresis. Positive samples were purified using 20 µL of the reaction PCR with 2 µL de Clean Sweep PCR Purification (Appliedbiosystems), and 30 minutes in thermocycler. Two aliquots have been made and added 0,5 µL in each tube of the primer, *forward* e *reverse*. The sequencing in both directions by Sanger method (Sanger et al., 1977) in sequencer. Sequences obtained were aligned with reference sequences downloaded from GenBank using the program MEGA version 7 to determine genotypes.

3. Results

Positive *E. bieneusi* PCR amplifications were observed in 2 (3.3%) of the 60 fecal samples analyzed. These animals had 3 months and 5 years each, and they were from different houses. Both PCR products were successfully purified and sequenced presenting 100% similarity with genotype D. The nucleotide sequences obtained in the present study were deposited in the GenBank database under accession numbers.

4. Discussion

This is the first report of *E. bieneusi* in cats from Brazil. *E. bieneusi* has already been identified through PCR in cat feces from Asia: China (Karim et al., 2014; Li et al., 2015; Xu et al., 2016), Japan (Abe et al., 2009), Iran (Jamshidi et al., 2012) and Thailand (Mori et al., 2013); Europe: Germany (Dengjel et al., 2001), Switzerland (Mathis et al., 1999), Portugal (Lobo et al., 2006) and Poland (Piekarska et al., 2017); and South America: Colombia (Santín et al., 2006), with prevalences varying from 5 to 31.3% in studies with 40 or more samples. The prevalence observed in the present study (3.3%) is similar to that found in other studies conducted in countries where same diagnostic methodologies were applied. In the other single study conducted in South America (Santín et al., 2006), 46 cats between 15 days to 10 years of age were euthanized in Colombia and fecal samples were collected directly from the

rectum and ileum; eight (17%) animals were considered *E. bieneusi* positive after molecular analysis.

There is a lack of information on the occurrence and transmissibility of microsporids between humans and animals in Brazil. The first human episodes in this country occurred in 1993 in Rio de Janeiro, followed by reports in São Paulo and Ceará through techniques based on microscopy (Hirschfeld et al., 1993; Moura et al., 1993; Wuhib et al., 1994). In 1996, *E. bieneusi* was identified as the presumable responsible for severe diarrhea in six HIV+ patients, of whom five died (Brasil et al., 1996). Through molecular biology, *E. bieneusi* DNA was confirmed by PCR in nine patients from a group of 40 seropositive individuals who had chronic diarrhea (Brasil et al., 2000). In addition to these reports, human infection with microsporidia was detected in immunocompromised patients from a reference center in the São Paulo State of which 40.3% of 347 patients were positive for microsporids. Therefore, it is possible that the disease (microsporidiosis) is underdiagnosticated in other regions of the country.

E. bieneusi DNA has already been observed on fecal samples in Brazil collected from human (Feng et al., 2011), cattle (Fiuza et al., 2016), birds (Lallo et al., 2012, Cunha et al., 2016, 2017), pigs (Fiuza et al., 2015) and sheep (Fiuza et al., 2016b). In addition, it was also detected in a treated effluent water sample collected in the region of Campinas, São Paulo, which demonstrated a great possibility of dispersion of this agent even after sewage treatment (Yamashiro et al., 2017). However, the risks of transmission and occurrence of the clinical disease in the country still remain uncertain and need further clarification.

No clinical symptomatology have been associated with domestic animals in Brazil; in cattle from the State of Rio de Janeiro, Fiuza et al. (2016) compared feces consistency and the body condition score from animals in different age groups; however, the association between such parameters and the occurrence of *E. bieneusi* could not be confirmed. In the present study, all feces collected from cats were diarrheic; however, due to the low prevalence observed and to the non-comprehensive diagnosis of other parasitic, bacterial and viral etiological agents expected to cause diarrhea, we could not correlate *E. bieneusi* presence and this clinical manifestation. Similarly, Dengjet et al. (2011), when analysing 60 diarrheic cat feces in Germany, found only three *E. bieneusi* positive samples; Piekarska et al. (2017) analyzed 44 cat feces samples (nine diarrheic) of household cats in Poland and found a total of four *E. bieneusi* positive samples, whith just one being diarrheic. None of these studies could associate the presence of *E. bieneusi* DNA and diarrhea in the cats.

E. bieneusi genotyping adds essencial information to the knowledge of this microorganism, indicating both possible species-specific genotypes as well as those already found in more than one animal species. Genotypes found in humans and animals are considered zoonotic; even when clinical disease is not evident, the presence of the DNA of this organism in the feces suggests the presence of infection and the possibility of spores dissemination through feces.

Among more than 200 *E. bieneusi* genotypes known, 12 are considered specific to cats (Table 7), whereas other two have been reported in cats and other animals (Table 8); therefore, these genotypes are considered non-zoonotic. On the other hand, six genotypes already found in cats are considered zoonotic since they have also been observed in humans (Table 9). Genotypes D and Type IV are of major importance and are described in several countries in humans and in a wide variety of animal species (Table 9). In the present study, both positive cats had the genotype D. This genotype was described in cats for the first time by Mori et al. (2013) in Thailand, where it was detected in 22 of the 25 *E. bieneusi* positive animals, demonstrating that domestic cats may play an important role in the propagation of zoonotic microsporidiosis caused by this genotype. After this first description, genotype D was also observed in cats by Karim et al. (2014), Li et al. (2015) and Xu et al. (2016) in researches carried out in China. Therefore, this is the first report of genotype D in cats outside the Asian continent. In Brazil, genotype D has already been found in fecal samples from humans (Feng et al., 2011), cattle (Fiuza et al., 2016) and birds (Cunha et al., 2016; 2017), suggesting a possible zoonotic transmission risk in this country. In the study conducted in birds by Cunha et al. (2016), in the State of Minas Gerais, genotype D was the most prevalent, being found in 58.3% of fecal samples analyzed from chickens collected in public markets.

In a single research in cats from the American continent, Santin et al. (2006) found 17% of the 46 cats tested positive for *E. bieneusi* in Colombia by molecular methods, and four other genotypes were found (Type IV, WL11, Peru10 and D-like).

Our results reveal the presence of *E. bieneusi* infection in domestic cats in Brazil by a zoonotic genotype. Cats, along with dogs, are the most common companion pets which live inside homes around the world, with very close contact with humans of all ages and health conditions. The detection of a zoonotic genotype emphasizes the risk of human infection, since cats can contribute in the direct or indirect transmission of this parasite through the contamination of water and foods with spores. The present study thus includes cats as

potential dispersing agents of zoonotic genotype D in Brazil; however, further studies should be carried out to confirm this hypothesis.

The knowledge and identification of possible pathogenic agents transmitted by these animals is of major public health importance, especially to immunocompromised patients. Thus, for a better understanding of the zoonotic transmission of *E. bieneusi* in Brazil, new epidemiological investigations are necessary in cats and other animals, as well as simultaneous studies of these animals and human from the same residence.

Table 7: *Enterocytozoon bieneusi* genotypes only found in cats

Genotype (Synonym)	Host	Geographic distribution (Reference)
Ebfel1A	Cat	Switzerland (Mathis et al., 1999)
L	Cat	Germany (Dengjel et al., 2001);
		Portugal (Lobo et al., 2006)
PtEb III	Cat	Portugal (Lobo et al., 2006)
PtEb IV	Cat	Portugal (Lobo et al., 2006)
D-like	Cat	Colombia (Santin et al., 2006)
ETMK2	Cat	Thailand (Mori et al., 2013)
ETMK3	Cat	Thailand (Mori et al., 2013)
ETMK4	Cat	Thailand (Mori et al., 2013)
CC1	Cat	China (Karim et al., 2014a)
CC2	Cat	China (Karim et al., 2014a)
CC3	Cat	China (Karim et al., 2014a)
eb52	Cat	Poland (Piekarska et al., 2017)

Table 8: *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in cats and other hosts.

Genotype (Synonym)	Host	Geographic distribution (Reference)
CC4	Cat	China (Karim et al., 2014a)
	Cattle	China (Qi et al., 2017)
PtEb IX	Cat	China (Karim et al., 2014a)
	Dog	Poland (Piekarska et al., 2017)
		Switzerland (Mathis et al., 1999)
		Portugal (Lobo et al., 2006)
		Japan (Abe et al., 2009)
		Colombia (Santin et al., 2008)
		United States of America (Feng et al., 2011)
		China (Xu et al., 2016b)

Table 9: *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in cat and human (and other host in some genotypes).

Genotype (Synonym)	Host	Geographic distribution (Reference)
D (PigEBITS 9, WL8, Peru9, CEbC, PTEb	Human	Cameroon (Breton et al., 2007)
		Gabon (Breton et al., 2007)

VI)		Peru (Bern et al., 2005; Cama et al., 2007; Sulaiman et al., 2003a)
		England (Sadler et al., 2002)
		Niger, Vietnan (Espern et al., 2007)
		Nigeria (Akinbo et al., 2012; Ayinmode et al., 2011; Maikai et al., 2012)
		Malawi, Netherlands (ten Hove et al., 2009)
		Iran (Agholi et al., 2013a, b)
		Thailand (Leelayoova et al., 2006; Prasertbun et al., 2017; Saksirisampant et al., 2009)
		Russia (Sokolova et al., 2011)
		Congo (Wumba et al., 2012)
		China (Wang et al., 2013a; Wang et al., 2013b)
		Portugal (Lobo et al., 2012)
		Tunisia (Chabchoub et al., 2012)
		Poland (Kicia et al., 2014)
		India (Li et al., 2013)
		Democratic Republic of São Tomé and Príncipe (Lobo et al., 2014)
		Brazil (Feng et al., 2011)
		Spain (Galván et al., 2011)
	Cat	China (Karim et al., 2014a; Li et al., 2015; Xu et al., 2016b)
		Thailand (Mori et al., 2013)
		Brazil ***(this study)***
	Wild boar	Czech Republic (Nemejc et al., 2014)
		Slovak Republic (Nemejc et al., 2014)
	Pig	United States of America (Buckholt et al., 2002)
		Japan (Abe and Kimata, 2010)
		Thailand (Prasertbun et al., 2017)
		China (Li et al., 2014a; Zhao et al., 2014b)
		Czech Republic (Sak et al., 2008)
	Cattle	South Africa (Abu Samra et al., 2012)
		China (Li et al., 2016a; Qi et al., 2017; Zhao et al., 2015c)
		Argentina (Del Coco et al., 2014)
		Brazil (Fiuza et al., 2016b)
		Korea (Lee, 2007, 2008)
	Sheep	China (Zhao et al., 2015b)
	Goat	China (Shi et al., 2016; Zhao et al., 2015b)
	Takin	China (Zhao et al., 2015a)
	Beaver	United States of America (Sulaiman et al., 2003b)
	Fox	United States of America (Sulaiman et al., 2003b)
		Spain (Galvan-Diaz et al., 2014)
		China (Yang et al., 2015; Zhao et al., 2015d)
	Muskrat	United States of America (Sulaiman et al., 2003b)
	Northern raccon	China (Li et al., 2016b)
	River otter	United States of America (Guo et al., 2014)
	Raccoon	United States of America (Sulaiman et al., 2003b)
		China (Xu et al., 2016a; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2015d)
	Falcon	Abu Dhabi (Muller et al., 2008)
	Rabbit	Spain (Galvan-Diaz et al., 2014)
	Horse	Czech Republic (Wagnerova et al., 2012)
		Algeria (Laatamna et al., 2015)
		China (Qi et al., 2016)

		Colombia (Santin et al., 2010)
	African lion	China (Li et al., 2016b)
	Asian golden cat	China (Li et al., 2016b)
	Dog	Portugal (Lobo et al., 2006)
		China (Karim et al., 2014a; Xu et al., 2016b)
	Pigeon	Iran (Pirestani et al., 2013)
	Mice	Czech Republic (Sak et al., 2011)
		Germany (Sak et al., 2011)
	Birds	Brazil (Cunha et al., 2016; da Cunha et al., 2017)
	Northern white cheeked gibbon	China (Li et al., 2016b)
	Golden snub-nosed monkey	China (Li et al., 2016b)
	Olive baboon	China (Li et al., 2016b)
	Primate	China (Karim et al., 2015; Karim et al., 2014b; Karim et al., 2014c)
	Baboon	Kenya (Li et al., 2011)
	Macaque	United States of America (Chalifoux et al., 2000)
		China (Ye et al., 2014)
Type IV (K, Peru2, BEB5, CMITS1, BEB-var, PtEB III)	Human	Cameroon (Breton et al., 2007; Sarfati et al., 2006)
		Gabon (Breton et al., 2007)
		Peru (Bern et al., 2005; Cama et al., 2007; Sulaiman et al., 2003a)
		England (Sadler et al., 2002)
		Uganda (Tumwine et al., 2002)
		Niger (Espern et al., 2007)
		Iran (Agholi et al., 2013a)
		China (Wang et al., 2013b)
		Nigeria (Akinbo et al., 2012; Ayinmode et al., 2011; Maikai et al., 2012)
		Portugal (Lobo et al., 2012)
		France (Liguory et al., 1998; Liguory et al., 2001)
		Democratic Republic of São Tomé and Príncipe (Lobo et al., 2014)
		Malawi (ten Hove et al., 2009)
		Netherland (ten Hove et al., 2009)
	Cat	Germany (Dengjel et al., 2001)
		Portugal (Lobo et al., 2006)
		China (Li et al., 2015; Xu et al., 2016b)
		Japan (Abe et al., 2009)
		Colombia (Santin et al., 2006)
	Cattle	United States of America (Santin et al., 2012; Sulaiman et al., 2004)
		Korea (Lee, 2008)
	Chipmunk	United States of America (Guo et al., 2014)
	Woodchuck	United States of America (Guo et al., 2014)
	Meadowvole	United States of America (Guo et al., 2014)
	Squirrel	United States of America (Guo et al., 2014)
	Black bear	United States of America (Guo et al., 2014)
	Primate	China (Karim et al., 2014b; Karim et al., 2014c)
	Ostriches	Spain (Galvan-Diaz et al., 2014)
	Birds	Brazil (Cunha et al., 2016)
	Snake	China (Karim et al., 2014d)
	Monkey	China (Karim et al., 2015)
	Rhesus monkeys	China (Ye et al., 2012)
	Dog	China (Karim et al., 2014a)
		Colombia (Santin et al., 2008)

I (BEB2, CEbE)	Human	China (Zhang et al., 2011)
	Cat	China (Karim et al., 2014a)
	Cattle	Germany (Dengjel et al., 2001; Rinder et al., 2000)
		Czech Republic (Jurankova et al., 2013)
		Korea (Lee, 2007, 2008)
		China (Jiang et al., 2015; Li et al., 2016a; Ma et al., 2015b; Qi et al., 2017; Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2015c)
		Argentina (Del Coco et al., 2014)
		Brazil (Fiuza et al., 2016b)
		South Africa (Abu Samra et al., 2012)
		United States of America (Fayer et al., 2012; Fayer et al., 2007; Santin et al., 2012; Santin and Fayer, 2009; Santin et al., 2005; Sulaiman et al., 2004)
		Algeria (Baroudi et al., 2017)
	Primate	China (Karim et al., 2014b)
	White tailed deer	United States of America (Santin and Fayer, 2015)
	Yak	China (Ma et al., 2015a)
	Pig	Spain (Galvan-Diaz et al., 2014)
BEB6 (SH5)	Human	China (Wang et al., 2013b)
	Cat	China (Karim et al., 2014a)
	Sheep	Brazil (Fiuza et al., 2016a)
		China (Jiang et al., 2015; Li et al., 2014b; Shi et al., 2016; Ye et al., 2015; Zhao et al., 2015b)
		Sweden (Stensvold et al., 2014)
	Cattle	United States of America (Fayer et al., 2007)
	Hog deer	China (Li et al., 2016b)
		China (Li et al., 2016b)
		China (Li et al., 2016b)
	Alpaca	China (Li et al., 2016b)
	Sika deer	China (Li et al., 2016b; Zhao et al., 2014a)
	Red deer	China (Li et al., 2016b)
	Primate	China (Karim et al., 2015; Karim et al., 2014b)
	Horse	China (Qi et al., 2016)
	Goat	Peru (Feng et al., 2011)
		China (Shi et al., 2016; Ye et al., 2015; Zhao et al., 2015b)
Peru10	Human	Peru (Bern et al., 2005; Cama et al., 2007; Sulaiman et al., 2003a)
	Cat	Colombia (Santin et al., 2006)
WL11 (Peru5)	Human	Peru (Bern et al., 2005; Cama et al., 2007; Sulaiman et al., 2003a)
	Cat	Colombia (Santin et al., 2006)
	Dog	Colombia (Santín et al., 2008)
	Fox	United States (Sulaiman et al., 2003b)

References

Abe, N., Kimata, I., Iseki, M., 2009. Molecular Evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan. J. Vet. Med. Sci., 71, n. 2, 217–219.

Akinbo, F.O., Okaka, C.E., Omoregie, R., Adamu, H., Xiao, L. 2013. Unusual *Enterocytozoon bieneusi* genotypes and *Cryptosporidium hominis*subtypes in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89, 157–161.

Cunha, M.J.R., Cury, M.C., Santín, M., 2016. Widespread presence of human-pathogenic Enterocytozoon bieneusigenotypes in chickens. Vet. Parasitol. 217, 108–112.

Brasil, P., de Lima, D.B., de Paiva, D.D., Lobo, M.S., Sodre, F.C., Silva, S.P., Villela, E.V.,Silva, E.J., Peralta, J.M., Morgado, M., Moura, H., 2000. Clinical and diagnosticaspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronicdiarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 42, 299–304.

Brasil, P., Sodré, F.C., Cuzzi-Maya, T., Gutierrez, M., Mattos, H., Moura, H. 1996Intestinal microsporidiosis in HIV-positive patients with chronic unexplained diarrhea in RJ, Brasil: diagnosis, clinical presentation and follow-up. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 38, 97–102.

Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of Enterocytozoon bieneusi in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2595–2599.

Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritzi, K., Spillmann, T., Thomschke, A.,Löscher, T., Gothe, R., Rinder, H., 2001. Zoonotic potential of Enterocytozoonbieneusi. J. Clin. Microbiol. 39, 4495–4499.

Deplazes, P., Mathis, A., Muller, C., Weber, R., 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 43, 93S.

Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., Modigliani, R., 1985. Occurrence of a new microsporidan: Enterocytozoon bieneusi n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool. 32, 250–254.

Didier, E.S., Weiss, L.M. 2006. Microsporidiosis: current status. Curr Opin Infect Dis. 19, 485-491.

Fayer, R., Santin, M., 2014. Epidemiology of Microsporidia in human infections. In: Weiss, L., Becnel, J.J. (Eds.), Microsporidia: Pathogens of portunity. John Wiley & Sons, Inc., pp.135–164.

Feng, Y., Li, N., Dearen, T., Lobo, M., Matos, O., Cama, V., Xiao, L., 2011. Development of a Multilocus Sequence Typing Tool for High-Resolution Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4822–4828.

Fiuza, V.R.S., Oliveira, F.C.R., Fayer, R., Santín, M., 2015. First report of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Brazil. Parasitol. Int. 64, 18–23.

Fiuza, V.R.S.; Lopes, C.W.G., OliveirA, F.C.R., Fayer, R., Santin, M. 2016a. New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. Vet. Parasitol. 216, 46–51.

Fiuza, V.R.S, Lopes, C.W.G., Cosendey, R.I.J., Oliveira, F.C.R., Fayer, R., Santín, M., 2016b. Zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in brazilian sheep. Res. Vet. Sci. 107, 196–201.

Hirschfeld, M.P.M., Cury AE, Moura H, et al. 1993. Identificação de microsporidia em 5 pacientes com AIDS no município de São Paulo. Rev. Bras. Parasitol. Vet.,2, 95.

Jamshidi, S.H., Tabrizi, A.S., Bahrami, M., Momtaz, H., 2012. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. Vet. Parasitol. 185, 121– 123.

Karim, M.R., Dong, H., Yu, F., Jian, F., Zhang, L., Wang, R., Zhang, S., Rume, F.I., Ning, C., Xiao, L., 2014. Genetic diversity in Enterocytozoon bieneusi isolates from dogs and cats in China: host specificity and public health implications. J. Clin. Microbiol. 52, 3297–3302.

Lallo, M.A., Calabria, P., Milanelo, L., 2012. Encephalitozoon and Enterocytozoon (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds. Vet. Parasitol. 190, 418– 422.

Li W., Diao R., Yang J., Xiao L., Lu Y., Li Y., Song M. 2014. High diversity of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in swine in northeast China. Parasitol. Res. 113, 1147–1153.

Li W., Li Y., Song M., Lu Y., Yang J., Tao W., Jiang Y., Wan Q., Zhang S., Xiao, L. 2015. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats anddogs in Heilongjiang province, China. Vet. Parasitol. 208, 125–134.

Lobo, M.L., Xiao, L., Cama, V., Stevens, T., Antunes, F., Matos, O. 2006. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 61–64.

Mathis, A., Breitenmoser, A.C., Deplazes, P., 1999. Detection of new *enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. Parasit. 6, 189-193.

Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporídia. Clin. Microbiol. Rev. 18, 423–445.

Mori, H., Mahittikorn, A., Thammasonthijarern, N., Chaisiri, K., Rojekittikhun, W., Sukthana, Y., 2013. Presence of zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* in cats in a temple in central Thailand. Vet. Parasitol. 197, 696–701.

Moura H, Cardoso RR, Veloso VG, et al. 1993. Microsporidia e diarréia crônica em AIDS: identificação de enterocytozoon em 2 pacientes no Rio de Janeiro. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – Resumos, Fortaleza, 180.

Piekarska, J., Kicia, M., Wesołowska, M., Kopacz, Ż., Gorczykowsk, M., Szczepankiewicz, B., Kváč, M., Sak, B., 2017. Zoonotic microsporidia in dogs and cats in Poland. Vet. Parasitol. 246, 108–111.

Prasertbun, R., Mori, H., Pintong, A., Sanyanusin, S., Popruk, S., Komalamisra, C., Tanasak, C., Buddhirongawatr, R., Sukthana, Y., Mahittikorn, A., 2017. Zoonotic potential of Enterocytozoon genotypes in humans and pigs in Thailand. Vet. Parasitol. 233, 73–79.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467.

Santin, M., Trout, J.M., Vecino, J.A.C., Dubey, J.P., Fayer, R., 2006. Cryptosporidium,Giardia and Enterocytozoon bieneusi in cats from Bogota (Colombia) andgenotyping of isolates. Vet. Parasitol. 141, 334–339.

Santin, M., Cortes Vecino, J.A., Fayer, R., 2008. Enterocytozoon bieneusi genotypes indogs in Bogota, Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79, 215–217.

Santin, M., Vecino, J.A., Fayer, R., 2010. A zoonotic genotype of Enterocytozoonbieneusi in horses. J. Parasitol. 96, 157–161.

Santin, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res. Vet. Sci. 90, 363–371.

Wagnerova, P., Sak, B., Kvetonovab, D., Bunatova, Z., Civiova, H., Marsalek, M., Kva, M., 2012. Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon cuniculi in horses kept under different management systems in the Czech Republic. Vet. Parasitol. 190, 573– 577.

Wuhib T, Silva TM, Newman RD, Garcia LS, Pereira ML, Chaves CS, et al. 1994. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. J. Infect. Dis. ;170, 494–497.

Xu, H., Jin, Y., Wu, W., Li, P., Wang, L., Li, N., Feng, Y., Xiao, L., 2016. Genotypes of Cryptosporidium spp., Enterocytozoon bieneusi and Giardia duodenalis in dogs and cats in Shanghai, China. Parasit. Vectors 9, 121.

Yamashiro, S., Fiuza, V.R.S, Teixeira, Â.T.L.S., Branco, N., Levy, C.E. , Castro, I.C.V.S., Franco, R.M.B., 2017. *Enterocytozoon bieneusi* detected by molecular methods in raw sewage and treated effluent from a combined system in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 112, 404-410.

ANEXOS

Anexo 1

FICHA DE CADASTRO ANIMAL

PROJETO: Ocorrência dos principais agentes infecciosos causadores de diarreia em uma população de gatos domésticos em Campo Grande, Mato Grosso do Sul

Data:_____ Ficha/Número:_____

Nome:_____ Sexo: _____ Idade: _____ Peso:_____

Espécie: _____ Raça: _____ Pelagem: _____

Proprietário: _____

Endereço:_____

Telefones:_____

- **Domiciliado:** ( ) Não ( ) Sim: Área Urbana ( ) Área rural ( )

- **Contactantes:** ( ) Não ( ) Sim - qual espécie e quantos _____

- **Tem acesso à rua:** ( ) Não ( ) Sim **Castrado:** ( ) Não ( ) Sim

- **Tipo de Dieta:** ( ) Caseira ( ) Comercial ( ) Mista

- **Vacinação:** ( ) Não ( )Sim- quais? _____

- **Vermifugação**: ( ) Não ( ) Sim - Data_____

- **Sinais Clínicos:**

  - **Alterações gastrintestinais**

    ( ) Sem sinais ( ) Diarreia ( ) Vômito ( ) Constipação

  - **Consistência das fezes:** ( ) Pastosa ( ) Líquida ( ) Presença de sangue

  - **Frequência:** ( ) Frequência normal ( ) Muito frequente

  - **Início dos sinais:** ( ) Agudo ( ) Crônico- Quanto tempo _____

    ( ) Diarreia intermitente

  - **Tratamentos anteriores**: ( ) Não ( ) Sim – Quais _____

  - **Outras alterações**

    ( ) Anorexia ( ) Desidratação ( ) Prostração

    ( ) Hipertermia ( ) Hipotermia ( ) Outros sinais _____

Observações:

_____

_____

FAUST: _____

PCR: _____

_____