



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli studi di Padova

**Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Scuola di Dottorato di ricerca in SCIENZE VETERINARIE

Indirizzo: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

Ciclo XXV

**CYTAUXZOOM SP.: UN PROTOZOO EMERGENTE NEL  
GATTO**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

**Coordinatore di Indirizzo:** Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Mario Pietrobelli

**Correlatori:** Ch. ma Prof.ssa Gioia Capelli  
Dr. Tommaso Furlanello  
Dr.ssa Laia Solano-Gallego

**Dottoranda:** Dr.ssa Erika Carli

*Alla mia famiglia  
e a chi se ne sente parte*



## *Ringraziamenti*

L'ultima cosa che sto scrivendo in questa tesi è la prima che voglio sia letta e cioè questa pagina di ringraziamenti.

Innanzitutto voglio ringraziare l'inventore del microscopio ottico, anche se non si sa chi sia. Galileo Galilei, uno dei possibili nomi, definì il microscopio di sua costruzione "un occhialino per vedere le cose minime". Chi come me lavora quotidianamente con questo strumento, sa quanto sia affascinante e, a volte, esaltante poter vedere "le cose minime" e può capire quanto sia stato entusiasmante il momento in cui ho visto per la prima volta *Cytauxzoon* nei globuli rossi di un gatto!

Incomincio con il ringraziare Marco Caldin che mi ha insegnato e trasmesso la sua passione per l'Ematologia. Lo ringrazio anche perché la Clinica San Marco, da lui diretta, ha totalmente finanziato questo progetto di ricerca.

Ringrazio Mario Pietrobelli che mi ha seguita e accompagnata da buon tutor in questo percorso e che ha accolto sempre con grande entusiasmo gli annunci delle mie gravidanze.

Grazie anche ai miei correlatori Tommaso Furlanello e Gioia Capelli, per avermi dato suggerimenti preziosi e spunti di riflessione.

Grazie a tutto lo staff del Laboratorio San Marco che ha sopportato il lavoro in più richiesto per analizzare i miei campioni sempre con estrema gentilezza e professionalità. In particolare, voglio ringraziare Eva Marcato, Arianna Martini,

Martina Nicetto e Carlo Masserdotti che mi hanno aiutata per la raccolta dei dati, l'analisi molecolare e gli esami istologici.

Un ringraziamento particolare va a Michele Trotta, spalla, amico e compagno di grandi chiacchierate su *Cytauxzoon*, che ha dato un contributo fondamentale allo studio molecolare di questo parassita.

Grazie anche a Fabrizio Montarsi, senza il quale non avrei saputo come dare un nome e cognome a pulci e zecche.

Un sentitissimo ringraziamento va a Laia Solano-Gallego, altro correlatore di questa tesi, ricercatrice e nome importante nella medicina veterinaria ma per me amica, "sorella spagnola" e fonte di entusiasmo professionale dalla quale ho imparato e sto imparando tantissimo, soprattutto sulle malattie trasmesse da vettori.

Infine grazie alla mia cuginetta Giorgia che ha messo a disposizione il suo tempo per leggere il mio inglese maccheronico.

Fin qui ho voluto nominare chi ha partecipato attivamente al lavoro scientifico ma ci sono altre persone che meritano la mia riconoscenza perché con la loro disponibilità e il loro aiuto mi hanno permesso di trovare il tempo da dedicare alla stesura di questa tesi.

Grazie mamma e papà che siete accorsi ogni volta che vi ho chiamati. Grazie al mio PG, (cosa farei senza di te!) che ha dipinto per me gli acquerelli dei gatti e che soprattutto mi ha supportato quando pensavo di non farcela e sopportato quando non ce la facevo! Grazie alla mia Cecilia, dono prezioso, che

ogni giorno mi dà l'entusiasmo verso la vita. Grazie anche a Bianca, che conoscerò tra due settimane e che in questi mesi, mentre ero davanti al computer, mi ha fatto compagnia con i suoi calcetti.

Domenica 15 dicembre 2013

# Indice

<b>Indice</b> .....	<b>6</b>
<b>Riassunto</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<i>Parte prima INTRODUZIONE</i> .....	<b>14</b>
<b>Rassegna della letteratura: <i>Cytauxzoon felis</i></b> .....	<b>15</b>
1. Classificazione e cenni storici .....	16
2. Diffusione e prevalenza.....	17
3. Ciclo biologico e vie di trasmissione .....	20
4. Fattori di rischio .....	28
5. Patogenesi .....	29
6. Segni clinico-patologici .....	31
7. Rilievi anatomico-patologici.....	36
8. Diagnosi.....	38
9. Terapia .....	43
10. Profilassi .....	45
11. Salute pubblica .....	47
<b>Rassegna della letteratura: <i>Cytauxzoon sp.</i></b> .....	<b>48</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>54</b>
<i>Parte seconda CYTAUXZOOON SP: IN ITALIA</i> .....	<b>62</b>
<b>Capitolo primo: <i>Cytauxzoon sp.</i> infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe</b> .....	<b>63</b>
Riassunto .....	64
Abstract.....	65
Introduction .....	66
Material and methods.....	67
Results.....	71
Discussion .....	74
Acknowledgments .....	78
References .....	78
<b>Capitolo secondo: <i>Cytauxzoon sp.</i> infection in two free ranging young cats: clinicopathological findings, therapy and follow up</b> .....	<b>89</b>
Riassunto .....	90
Abstract.....	91

Introduction .....	92
Material and methods and results .....	92
Discussion .....	94
Acknowledgments .....	97
References .....	97
<b>Capitolo terzo: First study of <i>Cytauxzoon</i> sp. transmission: evaluation of ectoparasites, uterus and fetus removed from infected domestic cats. Could a vertical transmission be considered?.....</b>	<b>103</b>
Riassunto .....	104
Abstract.....	105
Introduction .....	106
Material and methods.....	107
Results.....	109
Discussion .....	110
Acknowledgments .....	113
References .....	113
<b>Capitolo quarto: Prevalenza di <i>Cytauxzoon</i> sp. in Italia, rilievi epidemiologici e fattori di rischio associati all'infezione .....</b>	<b>122</b>
Materiali e metodi .....	124
Risultati.....	127
Conclusioni .....	129
Bibliografia.....	130
<b>Capitolo quinto: Discussione generale .....</b>	<b>138</b>

## *Riassunto*

*Cytauxzoon felis* (*C. felis*) è il patogeno responsabile della cytauxzoonosi, un'infezione protozoaria trasmessa da zecche che colpisce i felini selvatici e domestici. E' stato descritto e studiato principalmente negli Stati Uniti dove causa una malattia acuta, grave e fatale nella maggior parte dei gatti anche se raramente sono stati segnalati soggetti sopravvissuti all'infezione. Nei felini selvatici, al contrario, l'infezione da *C. felis* è caratterizzata da una parassitemia persistente in assenza di segni clinici e raramente si manifesta in forma acuta e fatale. Negli ultimi anni sono state riportate sporadiche segnalazioni di infezioni sostenute da un'altra specie da *Cytauxzoon* sp. nei felini selvatici e domestici in Mongolia, Spagna e Francia. In letteratura non sono disponibili ulteriori informazioni su questo patogeno e non ci sono segnalazioni riguardo la sua presenza in Italia. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati: 1) individuare la presenza di *Cytauxzoon* sp. in Italia e 2) approfondire la conoscenza sull'epidemiologia, la patogenesi, le vie di trasmissione, i vettori, le caratteristiche clinico-patologiche di questa infezione nel gatto.

E' stato individuato e descritto a Trieste il primo focolaio d'infezione da *Cytauxzoon* sp. in Europa (capitolo primo). Quindi è stato organizzato uno studio epidemiologico che ha coinvolto gatti scelti con criteri di casualità (sani, malati, di proprietà, randagi) tra i pazienti di alcuni ambulatori veterinari localizzati in tre aree sul territorio italiano (nordest, centro e sud). Per ciascun soggetto, oltre ai campioni da destinare agli esami di laboratorio, sono state



raccolte informazioni riguardanti anamnesi, stile di vita, contatti recenti o remoti con pulci e/o zecche, esecuzione della profilassi per gli ectoparassiti e presenza di eventuali segni clinici (capitolo quarto). Quindi, è stato valutato l'effetto di un protocollo terapeutico in due gattini infetti (capitolo secondo). Ancora, allo scopo di approfondire le modalità di trasmissione di *Cytauxzoon* sp., nei gatti di colonia che vivevano nel focolaio di Trieste e che venivano catturati nell'ambito delle campagne di sterilizzazione per il controllo delle nascite, sono stati raccolti gli ectoparassiti (zecche e pulci) presenti al momento della visita clinica e gli uteri ed eventuali feti delle femmine gravide (capitolo terzo). Infine, tutti i dati disponibili sono stati valutati mediante analisi statistica confrontando i soggetti infetti con quelli che non lo erano (capitolo quarto).

La diagnosi di infezione da *Cytauxzoon* sp. è stata fatta mediante individuazione dei piroplasmi nello striscio ematico e/o PCR del gene 18S ribosomiale e sequenziamento.

In questo lavoro è stata descritta per la prima volta l'infezione da *Cytauxzoon* sp. in Italia con una prevalenza del 23% nel focolaio di Trieste e del 2,59% sul territorio italiano. Le sequenze ottenute dai gatti infetti presentavano un'omologia del 93% con *C. felis* e del 99% con *Cytauxzoon* sp. descritto nei felini selvatici e domestici spagnoli, francesi e mongoli. I gatti infetti per la maggior parte erano giovani (<15 mesi), vivevano liberi o semiliberi ed erano persistentemente parassitemici, asintomatici e non anemici. Più raramente sono stati osservati soggetti con vari segni clinici che sono morti o sono stati

sottoposti ad eutanasia, mentre nella maggior parte dei casi l'infezione sembrava avere un andamento subclinico e cronico.

In una gatta gravida infetta, nei macrofagi, sono stati individuati inclusi compatibili con schizonti di *Cytauxzoon* sp. nella placenta e nel tessuto muscolare fetale. Questo ha fatto sospettare che per questa infezione sia possibile la trasmissione verticale. Inoltre le PCR eseguite su pulci (*Ctenocephalides felis felis*) e zecche (*Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus*) raccolte da alcuni gatti che vivevano nelle colonie di Trieste hanno dato esito negativo anche per i vettori ottenuti dai gatti infetti.

Infine sono stati descritti i risultati osservati dopo l'applicazione di un protocollo terapeutico a base di doxiciclina e imidocarb dipropionato a due gattini infetti. In un caso si è ottenuta negativizzazione della ricerca dei piroplasmici nello striscio ematico e della PCR per *Cytauxzoon* sp. durante tutto il periodo di monitoraggio (175 giorni). Nel secondo caso la parassitemia non si è risolta però la terapia non è stata eseguita completamente perché il proprietario aveva sospeso spontaneamente la somministrazione della doxiciclina dopo una settimana.

## *Abstract*

*Cytauxzoon felis* (*C. felis*) is a protozoan responsible for cytauxzoonosis, a tickborne infection which affects wild and domestic felids that has been firstly described and studied in the United States. Cytauxzoonosis is an acute, severe and fatal disease in most domestic cats, even if rarely cases of surviving to the infection have been reported. On the other hand, wild affected cats more often had a persistent parasitemia without clinical signs and rarely occurred in acute and fatal disease. Recently sporadic infections caused by *Cytauxzoon* sp. have been reported in wild and domestic cats in Mongolia, Spain and France. No further information about this pathogen is available and it has never been reported in Italy. The aims of this work were: 1) to identify the presence of *Cytauxzoon* sp. in Italy and 2) to increase knowledge about epidemiology, pathogenesis, ways of transmission, infection carriers and clinico-pathological findings of this infection in domestic cats.

The first *Cytauxzoon* sp. focus in Europe is been identified and described in Trieste (Northeastern Italy) (chapter one). Then it was organized an epidemiological study, involving cats randomly selected (healthy, sick, owned, stray) among patients of some veterinary clinics located in three areas of the Italian territory (Northeast, Central and South). Blood samples for laboratory tests and information on medical history, lifestyle, recent or remote contact with fleas and/or ticks, ectoparasites prophylaxis and clinical signs were collected for each cats (chapter fourth). Moreover, it was evaluated the effect of a therapeutic

protocol in two infected cats (chapter two). Ectoparasites (ticks and/or fleas) collected at the time of the clinical evaluation and uterus and fetus, if available, of pregnant females were taken from colony cats living on the Trieste's focus in order to investigate the *Cytauxzoon* sp. way of transmission. The cats involved in the study were captured as part of the campaigns of sterilization for birth control (chapter three). Finally, it was made a statistical analysis of all available data comparing infected and not infected subjects (chapter four).

The diagnosis of *Cytauxzoon* sp. infection was made by identification of piroplasms in the blood smear and/or by 18S rRNA gene PCR analysis and sequencing.

In the present work *Cytauxzoon* sp. infection has been described for the first time in Italy with a prevalence of 23% in the focus of Trieste (Northeastern Italy) and of 2.59% in the overall Italian territory. The sequences obtained from infected cats showed an homology of 93% with *C. felis* and 99% with *Cytauxzoon* sp. described in Mongol, Spanish and French wild and domestic felids.

The majority of the infected domestic cats were young (< 15 months), free or semi-free ranging, persistently parasitemic, asymptomatic and not anemic. Rarely cats died or were euthanized after showing various clinical signs while in most cases the infection seemed to be chronic and subclinical.

In a pregnant infected cat, tissues inclusions compatible with schizonts of *Cytauxzoon* sp. were observed inside macrophages in the placenta and fetal muscle tissue. Based on this finding it was suspected that this infection could be

vertically transmitted. In addition, the PCR analysis performed on fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and ticks (*Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus sanguineus*) collected from some cats living in the colonies of Trieste were all negative. Also vectors taken from infected cats resulted negative to PCR analysis.

Finally, a therapeutic protocol based on Doxycycline and Imidocarb dipropionate has been applied in two infected kittens. At the end of the therapy in one case blood smear evaluation for piroplasms and PCR analysis was negative throughout the follow up period (175 days). In the second cat the parasitemia is not resolved but treatment was not completely performed because the owner has spontaneously suspended administration of Doxycycline after a week.

*Parte Prima*

■ *INTRODUZIONE* ■



*Rassegna della letteratura*

*~Cyttauxzoon felis~*

## 1. Classificazione e cenni storici

Il termine *Cytauxzoon* è di derivazione greca e indica un incremento nel numero di cellule di un organismo. Nel 1948 Neitz e Thomas denominarono *Cytauxzoon* (box 1) il genere che raggruppava microorganismi ascrivibili a piroplasmii simili a quelli del genere *Theileria* e *Babesia*. Durante la fase tissutale, i parassiti del genere *Cytauxzoon* si localizzano negli istiociti sottoforma di schizonti singoli mentre quelli del genere *Theileria* si organizzano in schizonti multipli all'interno dei linfociti (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cytauxzoon>; Meinkoth e Kocan, 2005). Il genere *Babesia*, a differenza dei precedenti, non ha localizzazione tissutale ma solo eritrocitaria (Meinkoth e Kocan, 2005).

### BOX 1. *Cytauxzoon*: classificazione tassonomica

<b>DOMINIO</b>	Eukaryota	<b>SOTTORDINE</b>	Theileriina
<b>REGNO</b>	Chromalveolata	<b>GENERE</b>	<i>Cytauxzoon</i>
<b>SUPERPHYLUM</b>	Alveolata	<b>SPECIE</b>	<i>Cytauxzoon felis</i>
<b>PHYLUM</b>	Apicomplexa		<i>Cytauxzoon manul</i>
<b>CLASSE</b>	Aconoidasida		<i>Cytauxzoon strepsicerosi</i>
<b>ORDINE</b>	Achromatorida		<i>Cytauxzoon silvycaprae</i>

Tratta da <http://en.wikipedia.org/wiki/Cytauxzoon>

La prima segnalazione d'infezione attribuita a questo parassita fu fatta in Sudafrica nel 1948, nella silvicapra (*Sylvicapra grimmia*), dove fu individuata una



malattia fatale sostenuta da *Cytauxzoon silvycaprae* (Neitz e Thomas, 1948). In seguito, furono descritte infezioni anche in altri ungulati quali antilope alcina (*Taurotragus oryx*) (Neitz, 1957), antilope nera (*Hippotragus niger*) (Thomas et al., 1982), giraffa (*Giraffa camelopardis angolensis*) (Krecek et al., 1990) e tsessebe (*Damaliscus lunatus*) (Jardine, 1992).

Nel gatto, i primi casi di cytauxzoonosi furono osservati tra il 1973 e il 1975, in Missouri, in quattro soggetti che vivevano in aree rurali e boschive (Wagner, 1976). I gatti manifestarono una malattia grave e fatale, presenza di piroplasmii nei globuli rossi e di schizonti nei fagociti mononucleati associati all'endotelio vascolare di fegato, milza, polmoni e linfonodi (Wagner, 1976). Il patogeno responsabile di queste infezioni fu denominato *Cytauxzoon felis* (*C. felis*) da Kier nel 1979.

Sulla base della stretta relazione molecolare e filogenetica tra i generi *Theileria* e *Cytauxzoon* e della similitudine dei cicli biologici, alcuni Autori hanno proposto di riclassificare i patogeni isolati dagli ungulati africani come *Theileria* sp. (Nijhof et al., 2005). Di conseguenza, gli unici animali nei quali si registrano infezioni da *Cytauxzoon* restano i felini (Shock et al., 2011).

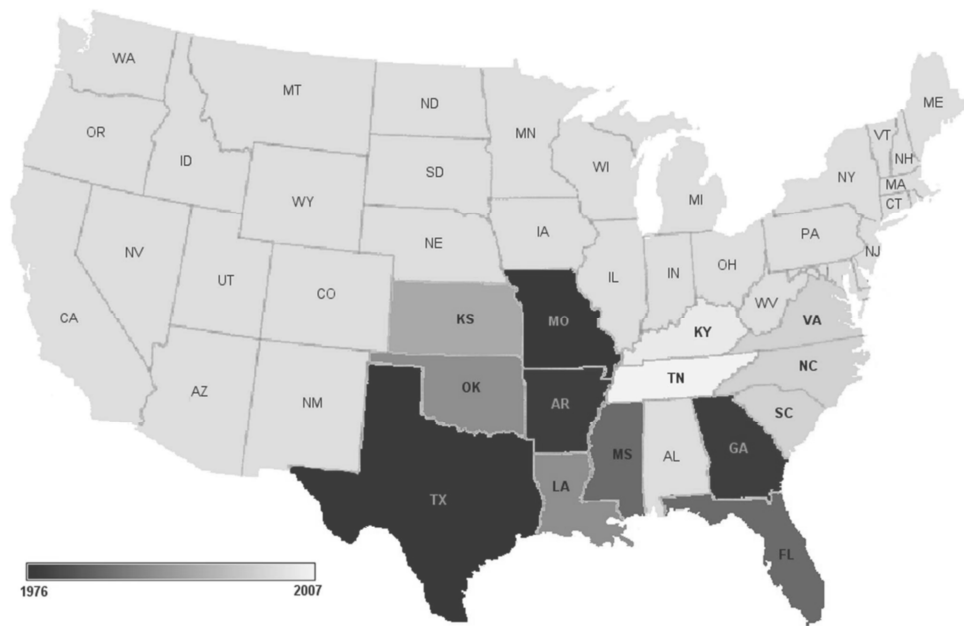
## *2. Diffusione e prevalenza*

---

Nei felini selvatici e domestici, *C. felis* è stato riportato principalmente negli stati del centro-sud, sud-est (Meinkoth e Kocan, 2005) e costa atlantica (Birkenheuer et al., 2006) degli Stati Uniti d'America. Nel corso degli anni, dopo

la prima descrizione nel gatto in Missouri, la letteratura riguardo questo patogeno si è arricchita d'informazioni e di nuovi casi raccolti principalmente in questa parte del mondo (Figura 1).

Figura 1. Distribuzione della cytauxzoonosi negli Stati Uniti (tratto da Tarigo et al., 2013)



Nel corso degli anni ci sono state sporadiche segnalazioni anche in territori diversi dagli Stati Uniti come in Brasile, dove *C. felis* è stato descritto sia nei felini selvatici (Peixoto et al., 2007; Andrè et al., 2009) che domestici (Mendes-de-Almeida et al., 2007). In uno zoo fu riportata l'infezione fatale di una leonessa di 8 anni e del suo cucciolo di 6 mesi (Peixoto et al., 2007) e la presenza di inclusi eritrocitari, che una successiva PCR confermò essere merozoiti di *C. felis*, in una pantera e in un leopardo (Peixoto et al., 2007). In un altro studio l'infezione fu diagnosticata in sei ocelot, due puma, e un giaguaro, tutti

asintomatici (Andrè et al., 2009). Infine, sempre in Brasile, è stata recentemente descritta, in un gatto, una coinfezione da *C. felis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' diagnosticata mediante PCR (Maia et al., 2013).

In Europa le segnalazioni di malattia causata da questo parassita sono molto rare. Una femmina adulta di tigre bianca (*Panthera tigris*), nata e vissuta in cattività in uno zoo in Germania, sviluppò un'infezione fatale caratterizzata da lesioni istologiche simili a quelle descritte nella cytauxzoonosi (Jacob e Wesemeier, 1996). Gli Autori ipotizzarono che l'animale si fosse infettato in seguito all'introduzione nello zoo di tre linci che provenivano dal Nord dell'America, però non fu possibile esaminare il loro sangue per confermare che fossero parassitemiche (Jacob e Wesemeier, 1996). Un'altra segnalazione fu fatta in Turchia, dove nove gatti di Van su 120 presentarono degli inclusi intraeritrocitari che furono classificati come *C. felis* (Karaka et al., 2007). I gatti erano asintomatici e non avvenne alcun decesso durante il periodo di osservazione (Karaka et al., 2007). Occorre rimarcare però, che in questo studio la diagnosi si era basata sulla sola osservazione microscopica dello striscio di sangue e non era stato eseguito nessun approfondimento di tipo molecolare.

La prevalenza dell'infezione varia secondo le aree geografiche, la presenza/assenza di segni clinici, la presenza dei reservoir e quella dei vettori (tabella 1 e 2).

Tabella 1. Prevalenza di *C. felis* nei felini selvatici e domestici (campioni ematici).

SEGNALAZIONE	GATTI	FELINI SELVATICI	DOVE
Rotstein et al., 1999		39% (P) e 36% (C)	Florida
Karaka et al., 2007	7.5%		Turchia
Haber et al., 2007	0.3%*		Florida, Carolina del Nord, Tennessee
André et al., 2009		13% (Pu, O, Y, M, G, Co, Gi)*	Brasile
Brown et al., 2010	30%		Arkansas e Georgia
Shock et al., 2011		20% (L)	11 stati degli Stati Uniti
Miller et al., 2013	61%		Kentucky

P: pantera della Florida (*Puma concolor cougar*); C: coaguaro del Texas (*Puma concolor stanleyana*); Pu: (*Puma concolor*); O: ocelot (*Leopardus pardalis*); Y: yaguarondi (*Puma yagouaroundi*); M: margay (*Leopardus wendii*); G: gatto tigre (*Leopardus tigrinus*); Co: colocolo (*Oncifelis colocolo*); Gi: giaguaro (*Panthera onca*); L: lince americana (*Lynx rufus*);

\*asintomatico

### 3. Ciclo biologico e vie di trasmissione

#### CICLO BIOLOGICO

Nei felini il ciclo biologico di *C. felis* prevede due fasi. Nella fase eritrocitaria si possono apprezzare i piroplasmii all'interno dei globuli rossi mentre nella fase tissutale si osservano gli schizonti, contenenti i merozoiti, in vari organi ed in particolare in polmoni, milza e fegato (Meinkoth e Kocan, 2005). Generalmente gli schizonti occupano il citoplasma dei fagociti mononucleati localizzati in prossimità del lume dei vasi o in sede subendoteliale, portando alla parziale o completa occlusione del lume vascolare (Meikoth e Kocan, 2005) (box 2). La fase schizogonica tissutale è breve mentre quella parassitemica è lunga (Blouin et al., 1987). La presenza di piroplasmii in

circolo non si associa alla comparsa dei segni clinici che, invece, diventano evidenti quando s'instaura la fase tissutale (Meinkoth e Kocan, 2005).

Fin dai primi studi sperimentali, infatti, si osservò che l'inoculazione di sangue di linci o di gatti con eritroparassitemia in gatti sani, provocava una parassitemia asintomatica, mentre all'inoculazione di omogenati di tessuti, ottenuti da soggetti infetti, seguiva la comparsa di segni clinici e la morte (Kier et al., 1982a). L'infezione del gatto con sangue raccolto da gatti morti per cytauxzoonosi può comportare l'insorgenza di una malattia fatale. Si ritiene che questo succeda perché i macrofagi, contenenti gli schizonti, possono essere presenti nel sangue periferico nelle fasi più avanzate della malattia (Meinkoth e Kocan, 2005). La localizzazione tissutale è fondamentale anche per avere un'immunità protettiva (Meinkoth e Kocan, 2005).

Se l'inoculazione del patogeno avviene con sangue periferico di linci americane (*Lynx rufus*) persistentemente infette, i gatti sviluppano eritroparassitemia ma non malattia. Infatti, in questi felini, a differenza di quanto succede nel gatto, molto spesso l'infezione si manifesta con persistente localizzazione del parassita a livello eritrocitario in assenza di segni clinici (Kier et al., 1982a) e fase tissutale spesso transitoria e autolimitante (Blouin et al., 1987). Più raramente la fase tissutale e la presenza degli schizonti si associano a comparsa di malattia sistemica e morte (Nietfield e Pollock, 2002).

## BOX 2. *C. felis* : ciclo biologico

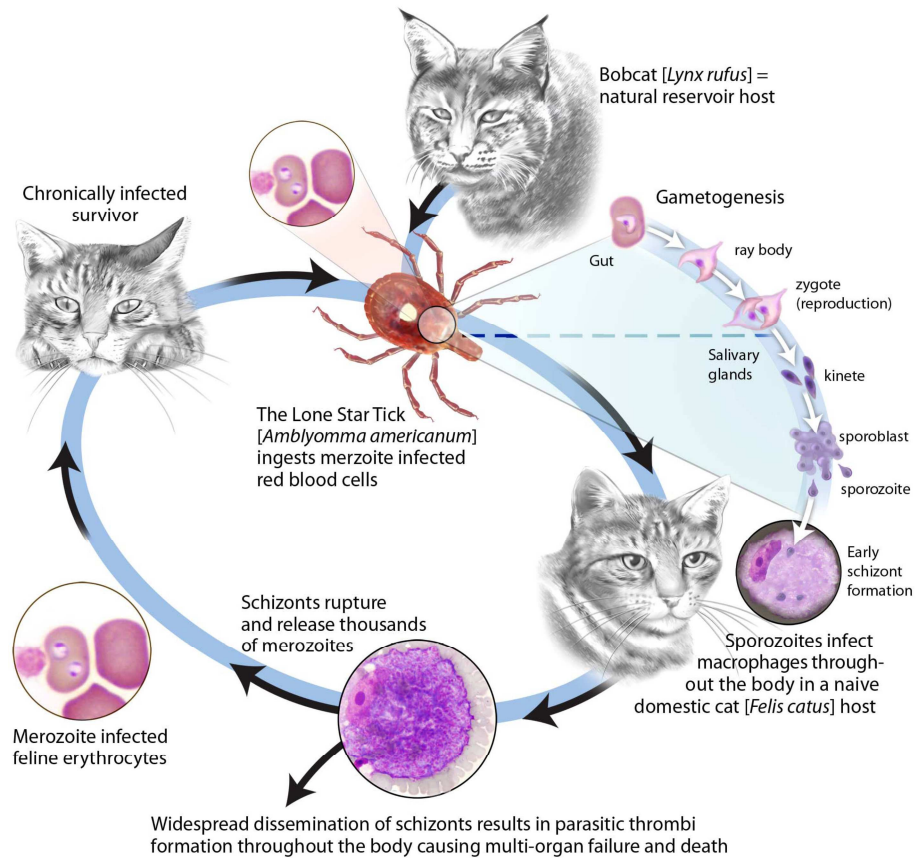


Immagine tratta da Tarigo et al., 2013.

Le zecche ingeriscono i parassiti circolanti presenti negli eritrociti dei felini selvatici o dei gatti sopravvissuti all'infezione, cronicamente infetti. Nell'intestino di queste, si differenziano macro e microgamonti che si riuniscono successivamente a formare lo zigote (Greene, 2006). Lo zigote sviluppa un oocinete che replica per via asessuata, attraversa la parete dell'intestino e si localizza nella ghiandola salivare. In questa sede, mediante merogonia, si formano gli sporoblasti. Quando la zecca infetta compie il pasto di sangue, rilascia in circolo gli sporozoiti che penetrano nei fagociti mononucleati dell'ospite dove replicano, mediante schizogonia e fissazione binaria, (Greene, 2006) evolvendo in macroschizonti e quindi in microschizonti (Kier et al., 1987). Le cellule parassitate diventano di grandi dimensioni e protendono nel lume vascolare, talvolta fino a occluderlo. I merozoiti contenuti negli schizonti vengono rilasciati in circolo, da qui penetrano nei globuli rossi rendendosi disponibili ad essere assunti da una nuova zecca, e perpetuando così il ciclo (Greene et al., 2006) che può ricominciare.

## RESERVOIR

Sulla base della differente evoluzione dell'infezione osservata negli studi sperimentali precedentemente riportati, la lince americana è stata considerata il reservoir naturale dell'infezione (Kier et al., 1982a; Glenn et al., 1983) e il gatto, un ospite non naturale, accidentale, di un'infezione aberrante (Blouin et al., 1984).

Non è da escludere che, oltre alla lince americana anche altri felini selvatici possono rappresentare una fonte d'infezione per il gatto. Infatti, è stata descritta eritroparassitemia asintomatica nelle pantere della Florida (*Felix concolor coryi*) e nei coguari del Texas (Rotstein et al., 1999). In uno studio sperimentale, in un gatto si ottenne la trasmissione di *C. felis* e l'insorgenza di una malattia fatale dopo l'inoculazione di cellule mononucleate del sangue periferico di una pantera della Florida (Butt et al., 1991). Recentemente è stato indicato nella tigre un altro possibile reservoir dell'infezione, dopo che alcuni esemplari asintomatici, che vivevano in un'area endemica per *C. felis*, sono risultati positivi alla ricerca del patogeno (Lewis et al., 2012). Sono stati descritti casi di malattia mortale in una tigre bianca (*Panthera tigris*) in Florida (Garner et al., 1996) e in Germania (Jacob e Wesemeier, 1996), in un coguaro orientale (*Puma concolor cougar*) in Florida (Harvey et al., 2007), in una lince americana in Kansas (Nietfield e Pollock, 2002) e in un leone in Brasile (*Panthera leo*) (Peixoto et al., 2007). Sulla base dell'osservazione di casi fatali, seppur rari, anche nelle linci americane, gli Autori hanno suggerito che, probabilmente, i decessi per

cytauxzoonosi nei felini selvatici avvengano più frequentemente di quanto registrato ma che sfuggano ai protocolli di sorveglianza degli animali che vivono liberi (Nietfield e Pollock, 2002).

Nel gatto sono stati riportati anche casi di sopravvivenza all'infezione naturale (Walker e Cowell, 1995; Meinkoth et al., 2000; Birkenheuer et al., 2006) o d'infezioni persistenti e asintomatiche (Haber et al., 2007; Brown et al., 2008) ma con minor frequenza rispetto ai felini selvatici. Le possibili spiegazioni che sono state fornite per questo fenomeno comprendono: 1) efficacia della terapia intrapresa, 2) possibile immunità innata a *C. felis* da parte di alcuni gatti, 3) vie d'infezione atipiche che esitano in parassitemie asintomatiche, 4) aumentata capacità di individuare i soggetti portatori, non riconosciuti prima, 5) infezioni da parte di un nuovo organismo, morfologicamente simile a *C. felis*, o 6) di un ceppo di *C. felis* meno virulento (Meinkoth et al., 2000; Brown et al., 2009). Di conseguenza, accanto al ben consolidato e noto ruolo di reservoir della linca, ed eventualmente degli altri felini domestici, alcuni Autori ipotizzano che anche i gatti, con le eritroparassitemie persistenti, possano trovare posto nel ciclo biologico del parassita (Meinkoth et al., 2000; Haber et al., 2007; Brown et al., 2008). I gatti sono da considerarsi quali reservoir addizionali, che potrebbero costituire una fonte d'infezione per le zecche anche nelle aree in cui le linci non sono presenti (Meinkoth et al., 2000; Haber et al., 2007) e che potrebbero aumentare il rischio di esposizione al patogeno per gli altri gatti (Brown et al., 2008).



## VETTORI

Sperimentalmente è stata evidenziata la trasmissione di *C. felis* dalla lince americana al gatto mediante la zecca *Dermacentor variabilis* (*D. variabilis*) (Blouin et al., 1984; Kocan et al., 1992) e da gatto a gatto mediante *Amblyomma americanum* (*A. americanum*) (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010). Queste specie sono state considerate, quindi, i vettori dell'infezione. In particolare il ruolo di *A. americanum* quale vettore competente, che gioca un ruolo primario nel mantenimento e nella distribuzione del parassita fra i felini selvatici, è stato confermato da più lavori (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010; Shock et al., 2011). Quello di *D. variabilis* non ha trovato il consenso dei vari Autori e resta perciò ancora da chiarire. Paragonando i risultati dei diversi studi che hanno coinvolto queste zecche, si può considerare la possibilità che vi sia una differente abilità tra le due specie nella trasmissione del patogeno e che diversi genotipi di *C. felis* possano avere una differente capacità di adattarsi ai vettori (Reichard et al., 2010). A conferma del fatto che *A. americanum* sembra essere il vettore più accreditato, è stato dimostrato che, rispetto a *D. variabilis*, l'incidenza della cytauxzoonosi si correla meglio con l'attività (Reichard et al., 2009) e la distribuzione (Birkenheuer et al., 2008) di questa zecca e che la prevalenza dell'infezione è significativamente elevata nei felini selvatici che risiedono nelle aree in cui si trova *A. americanum* (Shock et al., 2011 e 2012). Negli Stati in cui questa zecca ha una bassa densità o non è presente, come il Nord Dakota, la prevalenza di *C. felis* è molto bassa (2%) (Shock et al., 2011)

(tabella 2). Infine, al momento, l'unica zecca ingorgata in cui sia stato trovato *C. felis* è *A. americanum* (Reichard et al., 2010). La zecca *Rhipicephalus sanguineus* non è stata in grado di trasmettere l'infezione (Reichard et al., 2009). Inoltre nonostante la distribuzione della cytauxzoonosi si sovrapponesse anche a quella della zecca *Ixodes scapularis*, gli esperimenti di trasmissione fatti con questo ectoparassita non hanno dato esito favorevole (Reichard et al., 2009).

Tabella 2. Prevalenza di *C. felis* nelle linci americane basata su indagini molecolari (tratta da Shock et al., 2011)

STATO	DENSITA' <i>D. VARIABILIS</i>	DENSITA' <i>A. AMERICANUM</i>	PREVALENZA <i>C. FELIS</i>
Colorado	assente	assente	0%
California	alta	assente	0%
Ohio	alta	bassa	0%
Virginia	alta	bassa	0%
Nord Dakota	alta	assente	2%
Georgia	alta	alta	9%
Kansas	alta	alta	31%
Florida	alta	alta	36%
Kentucky	alta	alta	55%
Carolina del Sud	alta	alta	57%
Carolina del Nord	alta	alta	63%
Oklahoma	alta	alta	65%
Missouri	alta	alta	79%

La zecca, però, non è solo un mero vettore meccanico del patogeno ma, trasmettendo il parassita tramite il pasto di sangue, rappresenta parte integrante del ciclo biologico di *C. felis* (Meinkoth e Kocan, 2005) (box 2). Infatti, i gatti portatori cronici sono in grado di trasmettere l'infezione mediante la

zecca *A. americanum* (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010). I soggetti infettati sperimentalmente con questa zecca si sono ammalati (presentavano anche schizonti a livello tissutale) e nella maggior parte dei casi sono sopravvissuti mantenendo delle parassitemie subcliniche (Reichard et al., 2010).

#### ALTRE VIE DI TRASMISSIONE

Nella trasmissione di questa infezione non sono da escludere altre vie come, ad esempio, la via verticale che è stata documentata in altri protozoi quali *Babesia gibsoni* nel cane (Fukumoto et al., 2005), *Theileria equi* nel cavallo (Allsopp et al., 2007; Georges et al., 2011) e in un caso di babesiosi felina (Jacobson et al., 2007). Se questa modalità di trasmissione sia presente nella patogenesi dell'infezione da *C. felis*, resta ancora da chiarire. In letteratura, per il gatto, sono disponibili solamente due articoli a riguardo. In uno è stato descritto il caso di una gatta morta in seguito ad un aborto nella quale furono individuati, in vari organi, piroplasmii e schizonti ascrivibili a *C. felis*. La valutazione istologica dei tessuti fetali e della placenta però non rivelò presenza del parassita (Weisman et al., 2007). Nel secondo studio furono prese in considerazione tre cucciolate di gattini nati da femmine infette, ma in nessun soggetto fu possibile osservare la trasmissione verticale del patogeno (Lewis et al., 2012). Nonostante questi rilievi, gli Autori considerano che questa via di trasmissione sia poco comune e non escludono, quindi, che possa comunque avvenire e rappresentare un meccanismo d'infezione per i cuccioli (Lewis et al.,

2012). Per quanto riguarda i felini selvatici, l'infezione da *C. felis* è stata segnalata in un cucciolo di Pantera della Florida di 7 giorni asintomatico (Rotstein et al., 1999), in una lince di 2-3 mesi che aveva segni clinici compatibili con cytauxzoonosi e che presentava macrofagi contenenti schizonti in vari organi all'esame post mortem (Nietfeld e Pollock, 2003) e in un cucciolo di leone di 6 mesi in Brasile (Peixoto et al., 2007).

Un'altra possibile via d'infezione è la trasmissione mediante le trasfusioni di sangue, pertanto i gatti dovrebbero essere testati anche per *C. felis* prima di essere considerati donatori idonei (Reine et al., 2004).

#### *4. Fattori di rischio*

---

Età, sesso o razza non rappresentano fattori predisponenti per l'infezione da *C. felis* o la comparsa della malattia (Reichard et al., 2008). La cytauxzoonosi è stata descritta in gatti con età variabile tra i due mesi e i 15 anni (Meinkoth et al., 2000; Birkenheuer et al., 2006) anche se più spesso sono infetti i giovani-adulti (Cohn et al. 2013) che vivono completamente o in parte all'esterno (Birkenheuer et al., 2006b; Cohn et al., 2013).

Nel 2008, Reichard e collaboratori pubblicarono i dati ottenuti da uno studio retrospettivo, condotto in Oklahoma sui gatti, nel quale valutarono quali fossero i fattori di rischio ambientali e temporali legati alla diffusione e alla persistenza di questa infezione (Reichard et al., 2008). La diagnosi d'infezione sembrava seguire uno schema temporale bimodale con due picchi durante

l'anno, uno tra aprile e giugno e l'altro tra agosto e settembre. Tali picchi corrispondevano ai momenti di maggior attività dei vettori delle zecche *D. variabilis* e *A. americanum*. La maggior parte dei casi fu registrata nelle aree a bassa densità residenziale ma una certa percentuale fu osservata anche nella periferia delle aree urbane, soprattutto se in prossimità di zone alberate e di aree naturali o non gestite dall'uomo. Questo tipo di habitat è particolarmente gradito alle linci, ai mammiferi selvatici e alle zecche. Anche il clima caldo sembra rappresentare un fattore di rischio (Hoover et al., 1994).

## *5. Patogenesi*

---

La genesi delle alterazioni riscontrate nei soggetti affetti da cytauxzoonosi non è ancora del tutto chiarita. La rapida moltiplicazione di parassiti

a durante la fase tissutale causa la comparsa della forma grave della malattia (Greene, 2006) i cui sintomi sono spesso secondari all'ostruzione meccanica del flusso ematico. Questo dà compromissione del drenaggio venoso cui conseguono congestione e edema in vari tessuti (Kier et al., 1987). La congestione e l'anossia tissutale contribuiscono alla necrosi, alla tossiemia (Kier et al., 1987) e al rilascio di citochine infiammatorie che causano sindrome da risposta infiammatoria sistemica, sepsi, coagulazione intravasale disseminata (CID) e insufficienza d'organo multi-sistemica (Cohn, 2013). Anche la febbre potrebbe essere secondaria al rilascio di sostanze tossiche durante lo sviluppo di schizonti e merozoiti nelle cellule infette (Kier et al., 1987). L'anemia, che si

osserva nella fase eritrocitaria dell'infezione, è secondaria a fagocitosi e distruzione dei globuli rossi (Greene, 2006). La presenza di emorragie è conseguente alla trombocitopenia che può derivare da un meccanismo di consumo, che trova riscontro nella CID (Garner et al., 1996). La CID e la presenza di trombi hanno fatto ipotizzare che i gatti ammalati muoiano per una condizione simile allo shock (Greene, 2006). La grave dispnea, che caratterizza questo stato e accompagna le fasi terminali della malattia, potrebbe derivare dalla polmonite interstiziale descritta nei pazienti, che a sua volta potrebbe essere sempre secondaria alla liberazione di citochine proinfiammatorie e di molecole chemiotattiche prodotte dai parassiti (Sneider et al., 2010).

In uno studio in cui fu valutata la risposta immunitaria sistemica in corso di cytauxzoonosi, si rilevò un'elevata concentrazione delle citochine proinfiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . In particolare, per il TNF- $\alpha$  fu descritto un incremento statisticamente significativo nei gatti con malattia fatale rispetto ai gatti sani (Frontera-Acevedo et al., 2013). L'incremento di queste citochine fu chiamato in causa anche per spiegare la risposta infiammatoria acuta, aspecifica, osservata all'elettroforesi delle proteine sieriche dei soggetti infetti, che presentavano una diminuzione della concentrazione di albumina che poteva avere come concausa l'effetto inibitorio delle citochine sulla sintesi epatica (Frontera-Acevedo et al., 2013). A ulteriore conferma dello stato proinfiammatorio, vi fu anche l'osservazione, all'analisi immunostochimica di un incremento dell'espressione del CD18 (un'importante molecola di adesione

leucocitaria che aumenta durante i processi infiammatori) soprattutto nei neutrofili interstiziali e nei monociti infetti o attivati, localizzati in prossimità dei vasi (Frontera-Acevedo et al., 2013). Alla determinazione biomolecolare del CD18, i gatti morti per cytauxzoonosi e con malattia acuta mostrarono valori più elevati rispetto ai sopravvissuti e ai gatti sani (Frontera-Acevedo et al., 2013).

## *6. Segni clinici e rilievi di laboratorio*

---

### SEGNI CLINICI

La sintomatologia clinica associata all'infezione nel gatto è generalmente acuta e aspecifica (Holman e Snowden, 2009). Sperimentalmente la comparsa dei primi sintomi avviene tra 5 e 14 giorni dopo l'esposizione al parassita (Meinkoth e Kocan, 2005). I gatti infetti manifestano depressione, disidratazione, anoressia (Motzel e Wagner, 1990), letargia (Hoover et al., 1994), riluttanza al movimento, dolore generalizzato, vocalizzazioni, atassia, nistagmo (Meinkoth e Kocan, 2005) e tempo di riempimento capillare > 2 secondi (Hoover et al., 1994). Ittero e ipertermia (da 39,4°C a 44°C) sono spesso descritti (Meier e Moore, 2000; Meinkoth e Kocan, 2005; Greene, 2006), come pure tachicardia e tachipnea, con o senza difficoltà respiratoria (Cohn, 2013). Raramente è stato segnalato aborto (Weisman et al., 2007; Cohn et al., 2011): in un caso una gatta affetta da cytauxzoonosi è morta poco dopo aver abortito tre feti nel secondo trimestre della gravidanza (Weisman et al., 2007). All'esame fisico si possono

apprezzare anche splenomegalia, epatomegalia e linfadenomegalia (Cohn, 2013). Nella fase terminale compaiono ipotermia, dispnea (Meinkoth e Kocan, 2005) e talvolta crisi convulsive, ottundimento del sensorio (Cohn, 2013) e coma (Holman e Snowden, 2009). Sperimentalmente la maggior parte dei soggetti colpiti muore entro 9-15 giorni dall'infezione (Ferris, 1979) mentre in condizioni naturali il tempo che intercorre tra la comparsa dei sintomi e la morte è inferiore ai cinque giorni (Hoover et al., 1994). Senza trattamento il 97% dei gatti con segni clinici di cytauxzoonosi soccombe (Birkenheuer et al., 2006). Solitamente la morte sopraggiunge dopo 2-3 giorni dal picco febbrile (Greene, 2006).

La sintomatologia della forma acuta nei felini selvatici è sovrapponibile a quella del gatto (Garner et al., 1996) anche se in un caso di cytauxzoonosi, che ebbe evoluzione positiva, febbre, ittero e dispnea non comparvero (Harvey et al., 2007).

Nel gatto la sopravvivenza all'infezione è stata segnalata meno frequentemente rispetto alla morte. I primi casi furono osservati durante studi sperimentali in cui, nei gruppi di gatti coinvolti, alcuni soggetti sopravvissero (Ferris, 1979; Uilenberg et al., 1987; Motzel e Wagner, 1990) ma solo in uno di questi non era stato attuato alcun trattamento (Motzel e Wagner, 1990). In seguito, più Autori descrissero casi di sopravvivenza a infezioni naturali (Walker and Cowell, 1995; Meinkhot et al., 2000; Brown et al., 2008; Cohn et al., 2011). Alcuni di questi gatti presentarono febbre, depressione e anoressia, come



in corso di cytauxzoonosi, ma in forma più lieve; mentre altri risultarono del tutto asintomatici (Meinkhot et al., 2000; Brown et al., 2008). La sintomatologia durò 2-12 giorni e i veterinari clinici coinvolti negli studi, riferirono che i gatti ammalati e sopravvissuti non sembravano “così malati” se confrontati con quelli che morirono (Meinkoth et al., 2000). Non è chiaro se l’evoluzione positiva del quadro clinico sia influenzata dalla terapia farmacologica; infatti, la sopravvivenza è stata segnalata anche in gatti non trattati (Meinkhot et al., 2000). In alcuni casi fu possibile documentare, inoltre, una parassitemia persistente in assenza di rilievi clinico-patologici (Meinkhot et al., 2000; Brown et al., 2008; Lewis et al., 2012) fino a 29 mesi (Brown et al., 2008). In un caso descritto da Walker e Cowell nel 1995, la parassitemia arrivò a persistere addirittura per 6 anni (Meinkhot et al., 2000). E’ possibile che la parassitemia persistente sia fluttuante e che talvolta possa essere molto bassa (Meinkhot et al., 2000). In un coaguaro che fu visto per la prima volta con segni clinici di cytauxzoonosi fu dimostrata la presenza del patogeno e riconfermata dopo 15 anni (Harvey et al., 2007).

#### RILIEVI DI LABORATORIO

Nel gatto generalmente sono riportate alterazioni dei parametri di laboratorio aspecifiche e variabili. Sono state osservate neutropenia, linfopenia, trombocitopenia e anemia in varie combinazioni (Meier e Moore, 2000; Birkenheuer et al., 2006). L’anemia, che può non essere presente all’esordio della malattia, compare in corrispondenza dell’osservazione dei merozoiti in

circolo, all'interno dei globuli rossi (Cohn, 2013). E' non rigenerativa, di tipo normocitico-normocromico (Greene, 2006), caratterizzata da un PCV inferiore al 30% che può arrivare a valori minori del 20% durante il decorso dell'infezione (Holman e Snowden, 2009). Nelle fasi finali della malattia possono comparire grave leucopenia e/o trombocitopenia (Greene, 2006).

La parassitemia sperimentalmente (box 3) si osserva 6-8 giorni dopo l'inoculazione del patogeno (Franks et al., 1988). Ha entità molto variabile ma può aumentare in maniera drammatica in ventiquattro ore (Greene, 2006). La percentuale di globuli rossi parassitati, nei soggetti che soccombono, può variare approssimativamente da 1% a 20% ma può anche essere assente (Franks et al., 1988; Hoover et al., 1994; Greene et al., 2006).

L'iperbilirubinemia, secondaria a occlusione vascolare epatica e/o a emolisi, e l'iperglicemia sono spesso documentate nei soggetti ammalati (Hoover et al., 1994; Cohn et al., 2011). Meno frequentemente si osserva un lieve-moderato incremento degli enzimi epatici ALP e ALT (Hoover et al., 1994; Cohn et al., 2011), aumento della BUN (Birekenheuer et al., 2006) e lievi ipoproteinemia, ipoalbuminemia, ipocolesterolemia, ipocalcemia, iponatriemia e ipocaliemia (Hoover et al., 1994; Greene, 2006; Cohn et al., 2011). Per quanto riguarda l'elettroforesi, si può evidenziare un incremento della concentrazione delle  $\alpha_2$ -globuline, espressione di una risposta infiammatoria aspecifica delle proteine della fase acuta, e un incremento della concentrazione delle  $\beta$ -globuline attribuibile all'emolisi (Frontera-Acevedo et al., 2013). Inoltre nei soggetti con

malattia fatale sono stati registrati un aumento della concentrazione delle proteine totali e una diminuzione della concentrazione dell'albumina che sono risultati statisticamente significativi (Frontera-Acevedo et al., 2013).

All'esame delle urine spesso non sono presenti alterazioni (Cohn, 2013) eccetto la bilirubinuria che può rappresentare un rilievo comune (Hoover et al., 1994). Nel profilo coagulativo, quando disponibile, si possono osservare incremento di APPT e PT secondari a CID (Garner et al., 1996; Greene et al., 1999). Nei felini selvatici con infezione acuta i rilievi di laboratorio sono sovrapponibili a quelli riportati nei gatti (Harvey et al., 2007).

Nei soggetti che sopravvivono all'infezione, le alterazioni ematologiche tendono a rientrare, compresa l'anemia (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010; Cohn, 2013) che non si osserva nei casi d'infezioni croniche (Lewis et al., 2012). La parassitemia è notevolmente meno marcata rispetto ai soggetti con infezioni fatali, si aggira intorno allo 0,1-0,9% (Brown et al., 2008; Reichard et al., 2010) e può ridursi ulteriormente quando migliora la sintomatologia (Reichard et al., 2009). In questi soggetti non sono segnalate alterazioni biochimiche (Lewis et al., 2012) mentre è stato osservato un incremento da lieve a marcato della concentrazione delle  $\beta$ -globuline all'elettroforesi delle proteine sieriche (Frontera-Acevedo et al., 2013).

## *7. Rilievi anatomo-patologici*

---

Data la rapida e fatale evoluzione della malattia, all'esame necroscopico spesso i gatti sono in buono stato di nutrizione, con un buon pannicolo adiposo (Hoover et al., 1994 Jacob e Wesemeier, 1996) e presentano frequentemente ittero generalizzato e pallore (Greene, 2006). Sono stati segnalati idropericardio, idrotorace, linfonodi aumentati di volume, edematosi ed emorragici (Greene, 2006), fegato con bordi leggermente arrotondati e con aspetto screziato (Jacob e Wesemeier, 1996; Meier e Moore, 2000), splenomegalia (Greene, 2006), distensione venosa intraddominale (2-3 volte il lume originale) (Kier et al., 1987), polmoni edematosi e con congestione diffusa (Hoover et al., 1994), petecchie ed ecchimosi sulla superficie di cuore, polmoni (Wagner, 1976; Ferris, 1979), vescica, reni e meningi (Butt et al., 1991).

Alla valutazione microscopica le lesioni caratteristiche sono rappresentate dall'accumulo di numerosi fagociti mononucleati contenenti schizonti (box 3) che si localizzano principalmente nel lume delle vene e dei sinusoidi in sede polmonare, epatica, splenica e linfonodale (Wagner, 1976) ma anche nel cervello, cuore, rene e midollo osseo (Garner et al., 1996). Le cellule fagocitarie infette possono arrivare a triplicare le loro dimensioni originarie (Garner et al., 1994). Nei casi gravi l'accumulo di cellule parassitate può portare a completa occlusione dei vasi (Garner et al., 1996; Weisman et al., 2007) con conseguente trombosi.

### BOX 3. Rilievi microscopici

SANGUE I piroplasmii, presenti in sede intraeritrocitaria, possono avere forma rotondeggiante, ovale, bipolare, anaplasmoide e allungata (tabella sottostante). Le forme singole rotondeggianti e ovali sono quelle più spesso osservate ma, man mano che il grado di parassitemia aumenta, possono essere rilevabili anche microorganismi appaiati o disposti a croce maltese (3-4 parassiti) (Kier et al., 1987).

FORMA	DIMENSIONI	NUCLEO	CITOPLASMA
ROTONDA	1,0-2,2 $\mu\text{m}$	anulare o a mezzaluna	bluastro
OVALE	0,8-1,0 $\mu\text{m}$ X 1,5-2,0 $\mu\text{m}$	anulare o a mezzaluna	bluastro
BIPOLARE	1,2-2,4 $\mu\text{m}$	ai 2 margini	bluastro
ANAPLASMOIDE	0,3-0,7 $\mu\text{m}$	anulare o a mezzaluna	bluastro
ALLUNGATA	1,2-2,4 $\mu\text{m}$	ad un margine	bluastro

Dal punto di vista ultrastrutturale, nei piroplasmii si riconosce un nucleo singolo, circondato da una doppia membrana, microtubuli, ribosomi, vacuoli e mitocondri. Occasionalmente, alla valutazione dello striscio ematico, si possono riscontrare fagociti mononucleati di grandi dimensioni contenenti gli schizonti che potrebbero derivare dal tessuto circostante il punto in cui è stato eseguito il prelievo ematico (Kier et al., 1987).

TESSUTI Gli schizonti occupano il citoplasma dei fagociti mononucleati localizzati negli endoteli o nel lume vascolare di vari organi e tessuti. Il nucleo delle cellule parassitate è grande, vescicolare, a forma di fagiolo o con indentazioni multiple, talvolta eccentrico e con nucleolo singolo e prominente. Man mano che la malattia progredisce, il nucleo e il nucleolo appaiono sempre più indistinti fino a diventare quasi assenti, segno di degenerazione cellulare. Inizialmente il citoplasma delle cellule parassitate è finemente vacuolizzato o schiumoso per la presenza di schizonti immaturi, caratterizzati da contorni sottili, quasi indistinti. Successivamente gli schizonti maturano e assumono l'aspetto di grandi corpuscoli di varie forme e dimensioni con margini ben distinti (macroschizonti) (Kier et al., 1987). Quindi le cellule ospiti vanno incontro a fenomeni degenerativi (nucleo indistinto o assente) e, in sede intracitoplasmatica, presentano clusters di granuli di piccole dimensioni, intensamente basofili (Kier et al., 1987; Susta et al., 2009). I clusters di granuli sono indicati come microschizonti e i granuli sono i merozoiti che stanno gemmando (Kier et al., 1987).

Si possono osservare anche emboli costituiti da cellule contenenti schizonti nei vasi di medie dimensioni in varie sedi (Susta et al., 2009). Le lesioni polmonari sono frequenti e sono caratterizzate da occlusione da moderata a grave dei vasi di medio calibro e da polmonite interstiziale con edema e accumulo di neutrofili (Snider et al., 2010).

## 8. Diagnosi

---

La cytauxzoonosi può essere sospettata di fronte a un gatto che abbia accesso all'ambiente esterno (soprattutto se con le caratteristiche idonee alla biologia dei possibili vettori e reservoir) e che si presenti alla visita con depressione, febbre alta e, talvolta, pallore (come segno di anemia) e ittero (Greene, 2006). La diagnosi definitiva, però, si basa sull'identificazione del patogeno (Meinkoth e Kocan, 2005).

La valutazione di uno striscio ematico rappresenta il primo passo nell'iter diagnostico per la ricerca di *C. felis*, anche se presenta alcune limitazioni. Innanzitutto la presenza nei globuli rossi d'inclusi ascrivibili a piroplasmi (box 3) non è indicativa di cytauxzoonosi ma pone in diagnosi differenziale le infezioni da *Cytauxzoon* sp., *Theileria* sp. o *Babesia* sp. Morfologicamente infatti, quando si localizzano in questa sede, i suddetti parassiti sono indistinguibili. Inoltre, non sempre lo striscio ematico è positivo nei soggetti infetti perché, come riportato in precedenza, le parassitemie possono essere molto lievi e talvolta fluttuanti (Greene, 2006) e potrebbero sfuggire a una valutazione di

routine (Meinkoth e Kocan, 2005). L'osservazione dello striscio ematico nei casi sospetti deve essere molto accurata, il vetrino va completamente visionato (anche sui bordi) perché occasionalmente le cellule monucleate contenenti gli schizonti possono essere presenti anche nel sangue (Cohn, 2013). In ogni caso, di fronte ad un sospetto clinico di cytauxzoonosi e a un esito negativo della ricerca dei parassiti nello striscio ematico, si consiglia di ripetere la valutazione morfologica del sangue nei giorni successivi (Greene, 2006) e di affidarsi a metodiche in grado di rilevare anche bassissime cariche parassitarie (indagini molecolari).

La diagnostica per immagini non offre un contributo diretto alla diagnosi (Cohn, 2013). Per quanto riguarda la radiografia toracica sono stati descritti pattern polmonari interstiziali diffusi nei soggetti con segni respiratori (Meier e Moore, 2000; Cohn, 2013) anche se non sono state individuate caratteristiche radiografiche specifiche per questa malattia.

All'esame citologico di campioni ottenuti per agoaspirazione o impressione da milza, fegato e rene o a quello istologico su campioni prelevati da vari tessuti nei soggetti deceduti, è possibile osservare gli schizonti nei fagociti mononucleati e confermare il sospetto diagnostico (Greene, 2006) (box 3). Gli schizonti possono essere ritrovati a livello tissutale prima che siano osservabili i piroplasmii allo striscio ematico (Cohn, 2013). La diagnosi si può fare anche mediante la metodica dell'ibridazione in situ che offre performance migliori rispetto alla valutazione istopatologica tradizionale. Con l'ibridazione in situ è

stata osservata una diversa reattività nei vari organi ma anche nelle cellule all'interno dello stesso vaso. La milza, nonostante sia uno degli organi più parassitati, ha dato deboli segnali di positività mentre il polmone sembra essere più adatto all'utilizzo di questa metodica (Susta et al., 2009).

In letteratura è riportato un unico lavoro in cui è stata valutata la possibilità di utilizzare un test sierologico nella diagnosi dell'infezione da *C. felis*. In questo studio si produsse un antisiero specifico per *Cytauxzoon* che fu utilizzato per eseguire un test d'immunofluorescenza indiretta su campioni tissutali di gatti infetti e che diede buoni risultati. Con lo stesso metodo furono testati anche i sieri dei soggetti coinvolti. I risultati ottenuti sembravano indicare che non tutti i gatti sviluppassero un titolo anticorpale determinabile con il test (Shindel et al., 1978). Inoltre, quando l'analisi era positiva, lo era con titoli bassi e che si evidenziavano tardi nel corso della malattia (Shindel et al., 1978). Questo tipo di test però non è disponibile in commercio.

La PCR rappresenta la metodica più sensibile per la diagnosi d'infezione da *C. felis* (Birkenheuer et al., 2006; Brown et al., 2008). Nei primi lavori basati su una diagnosi molecolare era stato utilizzato un test che amplificava il gene 18S rRNA dai piroplasmidi in generale e con il successivo sequenziamento si era ottenuta l'identificazione del patogeno (Meinkoth et al., 2000). In seguito è stata creata una metodica specifica per *C. felis* (Birkenheuer et al., 2006). La PCR è di particolare utilità anche per l'individuazione dei gatti portatori asintomatici (Haber et al., 2007; Brown et al., 2008) che, a causa delle basse parassitemie,



potrebbero sfuggire all'identificazione morfologica. In questi soggetti, considerati i ridotti livelli di DNA parassitario presenti nel sangue, PCR ripetute oppure impiego di metodiche molecolari più sensibili, come la nested-PCR e la Real-Time PCR, potrebbero essere particolarmente utili (Brown et al., 2008). La PCR ha permesso inoltre di approfondire la conoscenza delle caratteristiche molecolari di questo patogeno (box 4).

## BOX 4. caratterizzazione genetica

Negli ultimi anni alcuni Autori hanno cercato di approfondire lo studio del genoma di *C. felis* affiancando alla valutazione di un frammento del gene 18S rRNA che, tradizionalmente ha fornito tutte le informazioni sul genoma di questo patogeno (Birkenheuer et al., 2006; Brown et al., 2009), lo studio di altri geni come ITS1 (Internal Transcribed Spacer region 1) e ITS2 (Internal Transcribed Spacer region 2) (Brown et al., 2009a). E' stato possibile rivelare così che c'è una variabilità delle sequenze nelle regioni ITS1 e ITS2 di *C. felis* nei soggetti sintomatici e che i genotipi ITS1-ITS2 variano geograficamente come ci si potrebbe aspettare in caso di presenza di ceppi protozoari diversi (Brown et al., 2009). Inoltre è stata evidenziata una forte associazione tra particolari genotipi ITS1-ITS2 e la sopravvivenza dei gatti all'infezione acuta (Brown et al., 2009a). Sono stati ottenuti risultati sovrapponibili anche su campioni istologici conservati, provenienti da gatti morti o soppressi per cytauxzoonosi (Brown et al., 2009b), su campioni di sangue raccolti da gatti asintomatici e di tessuto ottenuti da linci (Brown et al., 2010).

Sono stati descritti, inoltre, più genotipi ITS. In particolare, nel gatto, il genotipo ITSa è stato isolato sia da soggetti sani sia sintomatici ma che sono sopravvissuti all'infezione; il genotipo ITSb è stato ottenuto soprattutto da gatti con malattia fatale e il genotipo ITSd sia da soggetti asintomatici sia con malattia fatale (Brown et al., 2010). Naturalmente la sopravvivenza dei gatti all'infezione potrebbe non essere dettata solamente dal ceppo di *C. felis* che li parassita ma anche da altri fattori. Resta il fatto che i risultati osservati in questi lavori vanno sicuramente a supporto dell'ipotesi che ci possano essere ceppi di *C. felis* geneticamente distinti che possono avere un diverso impatto nell'evoluzione dell'infezione (morte vs sopravvivenza) (Brown et al., 2009a). Va detto però che, siccome lo stesso genotipo ITS può essere trovato sia nei soggetti asintomatici che in quelli ammalati o che soccombono, lo studio dei geni ITS1 e ITS2 non può essere applicato per la discriminazione della patogenicità dei diversi ceppi parassitari (Brown et al., 2010; Cohn et al., 2011).

Nelle linci asintomatiche sono stati individuati i genotipi ITSa, ITSi e ITSf che erano stati in precedenza isolati nei tessuti dei gatti infetti sottoposti a necropsia e un genotipo che non era mai stato individuato nei gatti (Brown et al., 2010).

## 9. Terapia

---

Al momento non è stata individuata una terapia sicuramente efficace per i soggetti affetti da cytauxzoonosi e non è del tutto chiaro se il trattamento favorisca l'evoluzione positiva del quadro clinico (Holman e Snowden, 2009). Spesso, infatti, i gatti colpiti da forme gravi di malattia sono sopravvissuti a prescindere dal fatto di aver ricevuto una terapia o meno (Cohn et al., 2012). Nel corso degli anni, sono stati testati vari principi attivi ma con scarsi o discordanti risultati. Parvaquone e buparvaquone non furono efficaci nel trattamento di un'infezione sperimentale da *C. felis*, anzi, uno dei due gatti non trattati, coinvolti nello studio, sopravvisse all'infezione (Greene et al., 1990). Un successo terapeutico fu registrato con l'utilizzo in sei gatti con diminazene aceturato o imidocarb dipropionato; solo uno dei gatti morì dopo la somministrazione del diminazene mentre gli altri sopravvissero (Greene et al., 1999). In altri studi, un solo gatto su quattro trattati con diminazene diacetato sopravvisse (Cohn, 2013) e non si osservò efficacia di questo principio attivo nell'eliminazione della parassitemia nei soggetti con infezione cronica (Lewis et al., 2012 e 2013). L'aumento della dose nei gatti cronicamente infetti determinò la comparsa di numerosi effetti collaterali quali vomito, salivazione, dolore nel punto d'inoculo, monoparesi, proteinuria e forse epatotossicità (Lewis et al., 2013). Anche l'imidocarb dipropionato non è in grado di ridurre la parassitemia nei gatti con infezioni croniche (Brown et al.,

2008; Cohn, 2013). Considerando i vari trattamenti ad attività antiprotozoaria, al momento quello che ha dato i migliori risultati consiste in un'associazione tra atovaquone e azitromicina (Cohn et al., 2012). Nel confronto tra due gruppi di gatti ammalati trattati uno con l'associazione atovaquone-azitromicina e l'altro con imidocarb dipropionato, si osservò una percentuale di sopravvivenza del 60% nel primo gruppo e del 26% nel secondo (Cohn et al., 2012). In entrambi i gruppi la parassitemia fu più bassa nei soggetti sopravvissuti rispetto a quelli morti (Cohn et al., 2013). Inoltre, si riportò una maggior probabilità di sopravvivenza nei gatti con parassitemia più bassa, con conta dei globuli bianchi più alta e con bilirubinemia più bassa (Cohn et al., 2012). Purtroppo però, nonostante quest'associazione abbia avuto una certa percentuale di successo, il tasso di mortalità dei soggetti affetti da cytauxzoonosi restava comunque elevato anche dopo l'applicazione del protocollo (Cohn et al., 2012).

La sopravvivenza dei gatti all'infezione da *C. felis* si può attribuire ad altri fattori rispetto al trattamento terapeutico, quali:

- 1) ceppi di parassiti meno virulenti (Bierkenheuer et al., 2006);
- 2) differente risposta immunitaria e al parassita nei diversi gatti;
- 3) schizogonia ridotta con conseguente malattia meno grave nei gatti che sopravvivono;
- 4) intervento da parte del medico nelle fasi più precoci della malattia nei gatti che sopravvivono rispetto a quelli che soccombono (Holman e Snowden, 2009).

**BOX 5. Posologia dei principi attivi utilizzati nel trattamento dell'infezione da *C. felis* nel gatto**

<b>PRINCIPIO ATTIVO</b>	<b>POSOLOGIA</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>
<b>Atovaquone*</b>	15 mg/kg, PO, q8h	Cohn et al., 2012
<b>Azitromicina*</b>	10 mg/kg, PO, q24h	Cohn et al., 2012
<b>Imidocarb dipropionato</b>	2-5 mg/kg, IM**	Greene et al., 1999; Brown et al., 2008
<b>Diminazene diacetato</b>	2mg/kg, IM o 3mg/kg, IM, in 2 somministrazioni, q7die	Greene et al., 1999; Lewis et al., 2012
<b>Parvaquone</b>	20-30 mg/kg, IM, die	Motzel e Wagner, 1990
<b>Buparvaquone</b>	5-10 mg/KG, IM, die	Motzel e Wagner, 1990

\*da somministrare in combinazione

\*\*da ripetere dopo 1-2 settimane

I gatti ammalati necessitano anche di una terapia di supporto scelta, caso per caso, sulla base dei segni clinici e di laboratorio. Si possono somministrare fluidi per reidratare, trasfusioni di sangue per contrastare l'anemia o la DIC o eparina (Cohn, 2013). Le terapie antibiotiche con enrofloxacin, doxiciclina e/o ampicillina, usate da sole o in associazione con i farmaci antiprotozoari, hanno sortito effetti discordanti o nulli (Walker e Cowell, 1995).

## *10. Profilassi*

Al momento non è disponibile un vaccino per la prevenzione dell'infezione da *C. felis*. Infatti, non essendo il parassita ancora coltivabile in vitro, non è possibile utilizzare le vie tradizionali per la produzione di un presidio profilattico (Tarigo et al., 2013). Data la gravità dell'infezione, l'elevato tasso di mortalità, la crescente diffusione e l'elevato costo dei farmaci utilizzati per il

trattamento sarebbe sicuramente molto utile avere a disposizione un vaccino per questa infezione (Tarigo et al., 2013). Nel primo lavoro che si è mosso in questa direzione, Tarigo et al. (2013) hanno studiato il genoma di *C. felis* per individuare un antigene che potesse essere utilizzato quale antigene vaccinale per la cytauxzoonosi. Gli Autori hanno individuato nel gene cf76 un potenziale candidato poiché è riconosciuto dal sistema immunitario umorale dei gatti, si conserva bene nei vari isolamenti ed è trascritto nel ciclo di *C. felis* a indicare che può conferire un'immunità protettiva (Tarigo et al., 2013). L'obiettivo di futuri studi sarà di arrivare a creare un vaccino che possa essere utilizzato nella pratica veterinaria per la prevenzione e protezione del gatto da questa grave infezione.

Al momento, in assenza di una profilassi vaccinale, la prevenzione dell'infezione si ottiene limitando l'esposizione alle zecche attraverso l'uso di presidi farmaceutici con effetto acaricida, evitando l'accesso all'ambiente esterno durante le stagioni in cui sono presenti le zecche, soprattutto nelle aree endemiche, e riducendo il contatto con ambienti infestati dai vettori. Non sono disponibili studi in cui si sia valutato per quanto tempo una zecca debba mantenersi attaccata ai gatti per trasmettere il patogeno. In ogni caso è sicuramente consigliabile ispezionare ogni giorno gli animali che vivono in ambienti endemici e che hanno accesso all'esterno (Birkenheuer et al., 2006b; Holman e Snowden, 2009) e rimuovere il prima possibile le zecche trovate (Meinkoth e Kocan, 2005). Recentemente, negli USA, sono stati pubblicati i

risultati di uno studio sull'efficacia di un collare a base di imidacloprid 10% e flumethrin 4,5% nella prevenzione della trasmissione di *C. felis* ai gatti da parte delle zecche *A. americanum* (Reichard et al., 2013). Dai dati raccolti dagli Autori, il collare sembra impedire che la zecca si attacchi al gatto e compia il pasto di sangue, prevenendo così la trasmissione di *C. felis* dai vettori infetti (Reichard et al., 2013).

## *11. Salute pubblica*

---

L'infezione da *C. felis* non è una zoonosi, però di fronte ad un soggetto infetto, si deve considerare che abbia avuto un contatto con una zecca che, oltre a questo patogeno, potrebbe avergli trasmesso altri agenti eziologici potenzialmente pericolosi per l'uomo. Si consiglia, quindi, di fare attenzione a ferite da aghi o a non avere contatti diretti sulla cute con il sangue dei gatti infetti (Cohn, 2013).

*Rassegna della letteratura*

*~Cytaxzoon sp.~*



Nel 2003 furono descritti per la prima volta dei piroplasmi, osservati nello striscio ematico di quattro gatti di Palla's importati in Oklahoma dalla Mongolia. Il sangue era stato analizzato entro due giorni dall'arrivo degli animali negli USA, mentre erano in quarantena, e in seguito all'analisi molecolare e filogenetica fu possibile stabilire che i piroplasmi erano ascrivibili a un patogeno simile ma non sovrapponibile a *C. felis* (Ketz-Riley et al., 2003). In uno studio molecolare più approfondito condotto, in seguito negli stessi animali, fu proposto il nome di *Cytauxzoon manul* (*C. manul*) per indicare il patogeno isolato e fu confermata l'esistenza di una relazione del tipo "sister group" tra *C. felis* e *C. manul* (Reichard et al., 2005).

In Europa, la prima segnalazione d'infezione da *Cytauxzoon* sp. nel gatto risale al 2004 quando in Spagna, in uno studio molecolare condotto su 100 soggetti, fu identificato un caso d'infezione. Il gatto non presentava segni clinici ed era negativo alla ricerca di piroplasmi nello striscio ematico. La PCR per il gene 18S RNA diede esito positivo e il successivo sequenziamento rivelò un'identità del 95% con *C. felis* e del 99% con *Cytauxzoon* sp. isolato in Mongolia (Criado-Fornelio et al., 2004).

La prima segnalazione europea su un felino selvatico fu fatta sempre in Spagna in un giovane maschio di lince iberica (*Lynx pardinus*) (Luaces et al., 2005). In lavori successivi, in questi felini si evidenziò una prevalenza per *Cytauxzoon* sp. tra 26,9% e 33% in Sierra Morena (Millan et al., 2007; García-Bocanegra et al., 2010) e si osservò una sieroprevalenza significativamente

elevata per *Toxoplasma gondii* nei soggetti che presentavano *Cytauxzoon* sp. nel sangue (García-Bocanegra et al., 2010) In Francia, in uno studio di caratterizzazione molecolare e di prevalenza degli emoprotozoi negli animali domestici, fu segnalato un caso di co-infezione da *Cytauxzoon* sp. ed *Hepatozoon canis* in un gatto e fu riportata una prevalenza per *Cytauxzoon* sp. pari allo 0,8%. (Criado-Fornelio et al., 2009).

Gli studi molecolari confermarono che anche *Cytauxzoon* isolato nei felini selvatici e domestici in Spagna e Francia, come in Mongolia, facevano parte di un unico gruppo che aveva una relazione di tipo “sister group” con *C. felis* (Reichard et al., 2005; Millan et al., 2007).

Nelle linci l’infezione fu osservata soprattutto in soggetti giovani e nel periodo primavera-estate (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007). I gatti di Palla’s infetti da *Cytauxzoon* sp. presentavano parametri ematici nella norma (Ketz-Reley et al., 2003) mentre nel caso descritto in Spagna, il gatto aveva Hct ed emoglobina diminuiti, iperglicemia, incremento degli enzimi epatici e dell’albumina (Criado-Fornelio et al., 2004). Le parassitemie osservate andavano da valori inferiori all’1% (Ketz-Reley et al., 2003; Joyner et al., 2007) fino a valori pari al 4% (Luaces et al., 2005). Nei gatti di Palla’s si osservò persistenza dei parassiti in circolo fino a 2,5 anni dopo la diagnosi (Reichard et al., 2005). Inoltre, in un soggetto morto per cause non imputabili alla presenza di *Cytauxzoon* sp., alla valutazione istologica non furono osservate lesioni tissutali ascrivibili al parassita (Ketz-Reley et al., 2003). In uno studio

sperimentale si valutò se l'inoculazione di sangue infetto da *C. manul*, proveniente da gatti di Palla's, potesse causare parassitemia associata o meno a malattia e se potesse indurre una protezione immunitaria a un successivo contatto con *C. felis* nel gatto domestico (Joyner et al., 2007). Entro 14 giorni dall'inoculazione comparve una lieve parassitemia (<1%) che fu documentata in alcuni casi fino a 37 giorni; alla valutazione istologica della milza non si osservarono schizonti. Inoltre tutti i soggetti, in seguito inoculati con omogenato di milza di gatti infetti con *C. felis*, si ammalarono e morirono entro cinque giorni. Da questo studio fu possibile trarre la conclusione che i gatti sono suscettibili all'infezione mediante la fase eritrocitaria di *C. manul* (Joyner et al., 2007).

Le informazioni fornite dalla letteratura su questo patogeno restano molto scarse soprattutto riguardo l'epidemiologia, la diffusione, il ciclo, la via di trasmissione, le manifestazioni cliniche e clinico-patologiche, la terapia e la profilassi. In particolare in Italia, nonostante siano presenti zecche (Box 6) e felini selvatici (Box 7), non ci sono segnalazioni d'infezioni da piroplasmia ascrivibili a *Cytauxzoon*.

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati:

- 1) individuare la presenza di infezioni da *Cytauxzoon* sp. in Italia;
- 2) acquisire informazioni sull'epidemiologia, la patogenesi, le vie di trasmissione, i vettori, le caratteristiche clinico-patologiche e la terapia delle infezioni sostenute da questo patogeno nel gatto.

## BOX 6. Le zecche presenti in Italia

Le zecche appartengono al phylum Artropoda, classe Arachnida, ordine Acarina e comprendono tre famiglie Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Le prime due famiglie sono presenti in Italia mentre la terza non è stata segnalata. Le zecche della famiglia Argasidae sono dette anche “zecche molli” perché sono prive di uno scudo chitinoso in tutti gli stadi di sviluppo mentre le zecche della famiglia Ixodidae sono dette “zecche dure” in quanto presentano uno scudo che ricopre tutto il dorso nei maschi e che si trova solo anteriormente nella femmina e negli stadi larvali (Khoury e Maroli, 2003).

	IXODIDAE	ARGASIDAE
SCUDO CHITINOSO	Presente su tutto il dorso nei maschi e solo nella parte anteriore nelle femmine e nelle larve	Assente
STADI DI SVILUPPO	Larva, ninfa, adulto	Larva, 1 <sup>a</sup> ninfa, 2 <sup>a</sup> ninfa, adulto
FEMMINA ADULTA	Muore dopo l’ovodeposizione	Depone le uova più volte e poi muore
LOCALIZZAZIONE	Sull’ospite	Di giorno nelle vicinanze dell’ospite e di notte su di esso per il tempo necessario a compiere il pasto di sangue
OSPITI	Rettili, roditori e uccelli per le forme immature e grossi mammiferi per gli adulti	Polli e piccioni, occasionalmente l’uomo
AMBIENTE	Sottobosco, anfratti, ambienti forestali (tranne <i>R. sanguineus</i> )	Sottobosco, pascoli poco soleggiati, radure
MALATTIE/PATOGENI TRASMESSI	TBE, <i>Babesia</i> , <i>Theileria</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Borrelia</i> , <i>Anaplasma</i> , <i>Francisella</i> , <i>Hepatozoon</i> , <i>Cytauxzoon</i> .	Peste suina africana, spirochete, febbre Q, “paralisi da zecche”

In Italia le zecche dure più spesso descritte nelle zone del nord est e del centro sono *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*), *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes canisuga*, *Dermacentus marginatus* e *Haemaphysalis punctata* (Estrada-Pena et al., 2004; Cringoli et al., 2005; Cassini et al., 2009, Iori et al., 2010; Montarsi et al., 2011). In Sud Italia sono state segnalate anche *Haemaphysalis inermis*, più raramente *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis parva* e *Haemaphysalis concinna* (Dantas-Torres e Otranto, 2013). Le zecche molli più diffuse sono *Argas reflexus* (*A. reflexus*) e *Ornithodoros coniceps* (Khoury e Maroli, 2003).

Le zecche più diffuse in ambiente urbano sono *A. reflexus*, la zecca del piccione e *R. sanguineus*, la zecca del cane (Khoury e Maroli, 2003).

## BOX 7. I felini selvatici presenti in Italia

In Italia è presente la lince euroasiatica (*Lynx lynx*) che è diffusa anche nel resto d'Europa e in Asia al nord dell'Himalaya (Figura 1). In passato questo felino fu perseguitato e addirittura sterminato a causa dell'attività di bracconaggio, per la sua pelliccia e a causa della sua presunta pericolosità, che si realizzava soprattutto nelle aggressioni al bestiame ([http://it.wikipedia.org/wiki/Lynx\\_lynx](http://it.wikipedia.org/wiki/Lynx_lynx)). Sul territorio italiano la lince si estinse tra il 1918 e il 1920. In seguito furono attuate delle campagne di reintroduzione in Svizzera e negli anni '80 la lince si riaffacciò sul nostro territorio diffondendosi lentamente nelle Alpi (Molinari et al., 2006) e negli Appennini. L'ambiente boschivo caratterizzato da un terreno aspro e roccioso rappresenta il suo habitat più tipico ma anche la pianura le può essere consona.



Figura 1. Diffusione della lince euroasiatica nel mondo (tratta da [http://it.wikipedia.org/wiki/Lynx\\_lynx](http://it.wikipedia.org/wiki/Lynx_lynx))

Il gatto selvatico (*Felis silvestris*) è un piccolo felino molto diffuso nel mondo (Africa, Europa, Asia) (Figura 2). In Europa è presente *Felis silvestris silvestris*. In Italia è stato segnalato nelle Alpi e nell'Appennino. E' un animale estremamente adattabile a diversi tipi di ambienti: nel territorio italiano vive soprattutto nelle foreste di latifoglie o miste ma anche nella macchia mediterranea e nelle aree costiere ([http://it.wikipedia.org/wiki/Felis\\_silvestris](http://it.wikipedia.org/wiki/Felis_silvestris)).

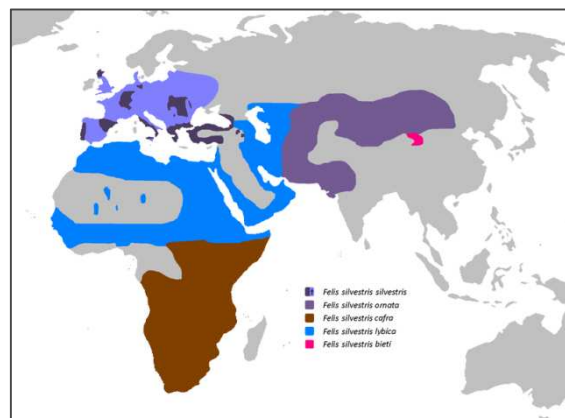


Figura 2. Diffusione del gatto selvatico nel mondo (tratta da [http://it.wikipedia.org/wiki/Felis\\_silvestris](http://it.wikipedia.org/wiki/Felis_silvestris))

## *Bibliografia*

- Andrè, M.R., Adania, C.H., Machado, R.Z., Allegretti, S.M., Filippe, P.A.N., Silva, K.F., Nagaki, A.C.H., Dagnone, A.S., 2009. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. *J. Wildl. Dis.* 45, 234-237.
- Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006a. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568-571.
- Birkenheuer, A.J., Marr, H., Allman, A.R., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006b. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Vet. Parasitol.* 137, 144-149.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Glenn, B.L., Kocan, K.M., Hair, J.A., 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildl. Dis.* 20, 241-242.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Jocan, K.M., 1987. Evidence of a limited schizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *J. Wildl. Dis.* 23, 499-501.
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O., Peterson, D.S., 2008. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 485-488.
- Brown, H.M., Berghaus, R.D., Latimer, K.S., Britt, J.O., Rakich, P.M., Peterson, D.S., 2009a. Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 59-63.
- Brown, H.; Modaresi, S.M., Cook, J.L., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2009b. Genetic variability of archived *Cytauxzoon felis* histologic specimens from domestic cats in Georgia, 1995-2007. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 493-498.
- Brown, H.M., Mitchell Lockhart, J., Latimer, K.S., Peterson, D., 2010. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. *Vet. Parasitol.* 172, 311-316.

- Butt, M.T., Bowmann, D., Barr, M.C., Roelke, M.E., 1991. Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from Florida panthers (*Felis concolor coryi*) to domestic cats. *J. Wildl. Dis.* 27, 342-347.
- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165, 30-35.
- Cohn, L.A., 2013. Cytauxzoonosis. In: *Canine and feline infectious disease*. E. Sykes, Elsevier pp. 739-746.
- Cohn, L.A., Birkenheur, A.J., Brunner, J.D., Ratcliff, E.R., Craig, A.W., 2011. Efficacy of Atovaquone and Azithromycin or Imidocarb dipropionate in cats with acute cytauxzoonosis. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 55-60.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasmids. *Vet. Parasitol.* 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73-76.
- Cringoli, G., Iori, A., Rinaldi, L., Veneziano, V., Genchi, G., 2005. *Mappe parassitologiche (6)*. Rolando Editore, p. 264.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Species diversity and abundance of ticks in three habitats in southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 251-255.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region. University of Zaragoza, Spain, p. 131.
- Ferris, D.H., 1979. A progress report on the status of a new disease of American cats: cytauxzoonosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1, 269-276.
- Franks, P.J., Harvey, R., Sheilds, R., Lawman, M., 1988. Hematological findings in experimental *Cytauxzoon felis*. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 24, 395-401.

- Frontera-Acevedo, K., Balsone, N.M., Dugan, M.A., Makemson, C.R., Sellers, L.B., Brown, H.M., Peterson, D.S., Creevy, C.R., Garner, B.C., Sakamoto, K., 2013. Systemic immune responses in *Cytauxzoon felis*-infected domestic cats. *Am. J. Vet. Res.* 74, 901-909.
- Garner, M.M., Lung, N.P., Citino, S., Greiner, E.C., Harvey, J.W., Homer, B.L., 1996. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Vet. Pathol.* 33, 82-86.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010. Factor affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. Parasitol.* 167, 36-42.
- Glenn, B.L., Kocan, A.A., Blouin, E.F., 1983. Cytauxzoonosis in bobcats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 1155-1158.
- Greene, C.E., Latimer, K., Hopper, E., Shoemaker, G., Lower, K., Cullens, F., 1999. Administration of diminazene aceturate or imidocarb dipropionate for treatment of cytauxzoonosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 497-500.
- Haber, M.D., Tucker, M.D., Marr, H.S., Levy, J.K., Burgess, J., Lappin, M.R., Birkenheuer, A.J., 2007. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. *Vet. Parasitol.* 146, 316-320.
- Harvey, J.W., Dunbar, M.R., Norton, T.M., Yablsey, M.J., 2007. Laboratory findings in acute *Cytauxzoon felis* infection in cougars (*Puma concolor cougar*) in Florida. *J. Zoo. Wildl. Med.* 38, 285-291.
- Hauck, W.N., Snider, T.G. 3<sup>rd</sup>, Lawrence, J.E., 1982. Cytauxzoonosis in native Louisiana cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 1472-1474.
- Holman, P.J., Snowden, K.F., 2009. Canine hepatozoonosis and babesiosis and feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 39, 1035-1053.
- Hoover, J.P., Walker, D.B., Hedges, J.D., 1994. Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 455-460.
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M.P., Galuppi, R., Cancrini, G., 2010. Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet. Parasitol.* 170, 291-296.



- Jacob, W., Wesemeier, H.H., 1996. A fatal infection in a Bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *J. Comp. Path.* 114, 439-444.
- Jardine, J.E., 1992. The pathology of cytauxzoonosis in tsessebe (*Damaliscus lunatus*). *J. S. Afr. Vet. Soc.* 63, 49-51.
- Joyner, P.H., Reichard, M.V., Meinkoth, J.H., Milne, V.E., Confer, A.W., Kocan, A.A., Hoover, J.P., 2007. Experimental infection of domestic cats (*Felis domesticus*) with *Cytauxzoon manul* from Palla's cats (*Otocolobus manul*). *Vet. Parasitol.* 146, 302-306.
- Karaka, M., Akkan, H.A., Tütüncü, M., Özdal, N., Değer, S., Ağaoğlu, Z.T., 2007. Cytauxzoonosis in Van Cats. *Yyü. Vet. Fak. Derg.* 18, 37-39.
- Ketz-Riley, C.J., Reichard, M.V., Van den Bussch, R.A., Hoover, J.P., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2003. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.* 39, 424-430.
- Kier, A.B., 1979. The etiology and pathogenesis of feline cytauxzoonosis. Ph.D. Thesis, Columbia, p. 239.
- Keir, A.B., Wagner, J.E., Kinden, D.A., 1987. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *J. Comp. Pathol.* 97, 415-432.
- Keir, A.B., Wagner, J.E., Morehouse, L.G., 1982a. Experimental transmission of *Cytauxzoon felis* from bobcats (*Lynx rufus*) to domestic cats (*Felis domesticus*). *Am. J. Vet. Res.* 43, 97-101.
- Kier, A.B., Wightman, S.R., Wagner, J.E., 1982b. Interspecies transmission of *Cytauxzoon felis*. *Am. J. Vet. Res.* 43, 102-105.
- Kocan, A.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Mukolwe, W., 1992. A redescription of schizogony of *Cytauxzoon felis* in the domestic cat. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 653, 161-167.
- Krecek, R.C., Boomker, J., Penzhorn, B.L., Scheepers, L., 1990. Internal parasite of giraffe (*Giraffa camelopardis angolensis*) from Etosha National Park, Namibia. *J. Wildl. Dis.* 26, 395-397.

- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Downey, M.E., Whitney, M.S., Birkenheuer, A.J., 2012. Evaluation of *Cytauxzoon felis* in infection status in captive-born wild felids housed in an area endemic for the pathogen. J. Am. Vet. Med. Assoc. 241, 1088-1092.
- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., 2012. Diminazene diaceturato for treatment of chronic *Cytauxzoon felis* parasitemia in naturally infected cats. J. Vet. Intern. Med. 26, 1490-1493.
- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., 2013. Failure on of efficacy and adverse events associated with dose-intense diminazene diaceturate treatment of chronic *Cytauxzoon felis* infection in five cats. J. Feline Med. Surg. 16, 1-7.
- Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). J. Wildl. Dis. 41, 810-815.
- Maia, L.M., Cerqueira Ade, M., de Barros Macieira, D., de Souza, A.M., Moreira, N.S., da Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R., 2013. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). Res. Bras. Parasitol. Vet. 22, 289-291.
- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., 2005. Feline cytauxzoonosis. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 35, 89-101.
- Meinkoth, J., Kocan, A.A., Whitworth, L., Murphy, G., Fox, J.C., Woods, P., 2000. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998). J. Vet. Intern. Med. 14, 521-525.
- Meier, T.M., Moore, L.E., 2000. Feline cytauxzoonosis: a case report and literature review. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 36, 493-496.
- Mendes-de-Almeida, F., Labarthe, N., Guerrero, J., Faria, M.C., Branco, A.S., Pereira, C.D., Barreira, J.D., Pereira, M.J., 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linneus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Vet. Parasitol, 147, 9-15.

- Millan, J., Naranjo, V., Rodriguez, A., de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134, 995-1001.
- Miller, J., Davis, C.D., 2013. Increasing frequency of feline cytauxzoonosis cases diagnosed in western Kentucky from 2001 to 2011. *Vet. Parasitol.* 198, 205-208.
- Molinari, P., Bionda, R., Carmignola, G., Catello, M., Cetto, E., Filacorda, S., Gavagnin, P., Mingozi, T., Rodolfi, M., Molinari-Jobin, A., 2006. Status of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the Italian Alps: an overview 2000-2004. *Acta Biologica Slovenica* 49, 13-18.
- Montarsi, F., Maioli, G., Fois, F., Mereu Piras, P., Magliano, A., Pascucci, I., Toma, L., Mignone, W., Torina, A., Capelli, G., 2011. Uncommon ticks from Italy. In: *Proceedings of VII Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP7)*, Zaragoza, Spain, p. 213.
- Motzel, S.L., Wagner, J.E., 1990. Treatment of experimentally induced cytauxzoonosis in cats with parvaquone and buparvaquone. *Vet. Parasitol.* 35, 131-138.
- Neitz, W.O., 1957. Theileriosis, gonderioses and cytaunzoonoses. *Onderspoort J. Vet. Res.* 27, 275-430.
- Neitz, W.O., Thomas, A.D., 1948. *Cytauxzoon sylvicaprae* gen. nov., spec. nov., a protozoon responsible for hitherto undescribed disease in the duiker, *Sylvicapra grimmia* (Linné). *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 23, 63-76.
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 38, 607-610.
- Nijhof, A.M., Pillay, V., Steyl, J., Prozesky, L., Stoltsz, W.H., Lawrence, J.A., Penzhorn, B.L., Jongejan, F., 2011. Molecular characterization of *Theileria* species associates with mortality in four species of african antelopes. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5907-5911.

- Peixoto, P.V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.* 145, 383-387.
- Reichard, M.V., Edwards, A.C., Meinkoth, J.H., Snider, T.A., Meinkoth, K.R., Heinz, R.E., Little, S.E., 2010. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. *J. Med. Entomol.* 47, 890-896.
- Reichard, M.V., Meinkhot, J.H., Edwards, A.C., Snider, T.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Little, S.E., 2009. Transmission of *Cytauxzoon felis* to domestic cat by *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol.* 161, 110-115.
- Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91, 420-426.
- Rotstein, D.S., Taylor, S.K., Harvey, J.W., Bean, J., 1999. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *J. Wildl. Dis.* 35, 613-617.
- Shindel, N., Dardiri, A.H., Ferris, D.H., 1978. An indirect fluorescent antibody test for the detection of *Cytauxzoon*-like organisms in experimentally infected cats. *Can. J. Comp. Med.* 42, 460-465.
- Shock, B.C., Murphy, S.M., Patton, L.L., Shock, P.M., Olfenbuttel, C., Beringer, J., Prange, S., Grove, D.M., Peek, M., Butfiloski, J.W., Hughes, D.W., Lockhart, J.M., Bevins, S.N., VandeWoude, S., Crooks, K.R., Nettles, V.F., Brown, H.M., Peterson, D.S., Yabsley, M.J., 2011. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other felids in thirteen states. *Vet. Parasitol.* 175, 325-330.
- Snider, T.A., Confer, A.W., Payton, M.E., 2010. Pulmonary histopathology of *Cytauxzoon felis* infections in cat. *Vet. Pathol.* 47, 698-702.
- Susta, L., Torres-Velez, F., Zhang, J., Brown, C., 2009. An in situ ibridation and immunoistochemical study of cytauxzoonosis in domestic cats. *Vet. Pathol.* 46, 1197-1204.

Tarigo, J.L., Scholl, E.H., Bird, D.M., Brown, C.C., Cohn, L.A., Dean, G.A., Levy, M.G., Doolan, D.L., Tieu, A., Nordone, S.K., Felgner, P.L., Vigil, A., Birkenheuer, A.J., 2013. A novel candidate vaccine for cytauxzoonosis inferred from comparative apicomplexan genomics. *Plos One* 8, 1-9.

Thomas, S.E., Wilson, D.E., Mason, T.E., 1982. *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* spp. infecting sable antelope, *Hippotragus niger* (Harris, 1838), in southern Africa. *Onderspoort. J. Vet. Res.* 49, 163-166.

Uilenberg, G., Frassen, F.F.J., Perié, N.M., 1987. Relationships between *Cytauxzoon felis* and African piroplasmids. *Vet. Parsitol.* 26, 21-28.

Wagner, J.E., 1976. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 168, 585-588.

Walker, D.B., Cowell, R.L., 1995. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206, 1363-1365.

Weisman, J.L., Woldemeskel, M., Smith, K.D., Merrill, A., Miller, D., 2007. Blood smear from a pregnant cat that died shortly after partial abortion. *Vet. Clin. Path.* 36, 209-211.

# *Parte Seconda*

▪ *CYTAUXZONSP*

*IN ITALIA*▪



## *Capitolo Primo*

### *Cytauxzoon sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe*

Carli E, Trotta M, Chinelli R, Drigo M, Sinigoi L, Tosolini P, Furlanello T, Millotti A, Caldin M, Solano-Gallego L., 2012. *Vet Parasitol*, 183: 343-352

**Riassunto.** Nel gatto le informazioni sugli aspetti epidemiologici e clinico-patologici dell'infezione da specie di *Cytauxzoon* diverse rispetto a *Cytauxzoon felis* sono limitate e raramente descritte. In seguito all'identificazione di un quadro di cytauxzoonosi clinica in tre gatti di Trieste (Italia), è stato condotto uno studio epidemiologico che ha coinvolto gatti di colonia (n=63) e di proprietà (n=52), che vivevano in questa città, per determinare la presenza dell'infezione da *Cytauxzoon* sp. e valutare le caratteristiche clinico-patologiche e le variabili associate a essa. L'infezione da *Cytauxzoon* sp. è stata diagnosticata mediante PCR sul gene 18S rRNA nel 23% (27/118) dei gatti e mediante esame dello striscio ematico nel 15% (18/118) dei soggetti. Le sequenze del gene 18S rRNA ottenute hanno mostrato un'identità del 99% con quelle di *Cytauxzoon* sp. depositate in GenBank®, isolate dai felini selvatici e domestici in Spagna, Francia e Mongolia. La presenza dei parassiti nei globuli rossi è stata osservata soprattutto nei soggetti apparentemente sani. L'infezione da *Cytauxzoon* sp. è statisticamente associata con la vita in colonia e con uno stile di vita che preveda l'accesso all'ambiente esterno. Non sono state trovate associazioni statistiche tra positività alla PCR e razza, genere, presenza di zecche e/o pulci, stato clinico, alterazioni di laboratorio come l'anemia, infezioni da FIV e/o FeLV e tasso di mortalità. In quattro casi è stata monitorata e documentata la persistenza dell'infezione. In questo studio, è stata descritta per la prima volta l'infezione naturale da *Cytauxzoon* sp. nei gatti domestici in Italia. La predominanza di quadri di eritroparassitemia subclinica e l'evidenza delle infezioni persistenti sono di supporto all'ipotesi che il gatto domestico possa fungere da reservoir per questo patogeno.



**Abstract.** Information about epidemiological and clinicopathological aspects of domestic cat infection by species of *Cytauxzoon* other than *Cytauxzoon felis* is limited and it has rarely been reported. Following the detection of clinical cytauxzoonosis in three cats from Trieste (Italy), an epidemiological study was carried out in colony (n=63) and owned (n=52) cats from the same city to investigate the presence of *Cytauxzoon* sp. infection and to assess clinicopathological findings and variables associated with this infection. *Cytauxzoon* sp. infection was detected by 18S rRNA gene PCR in 23% (27/118) and by blood smear examination in 15% (18/118) of domestic cats. The 18S rRNA gene sequences obtained were 99% identical to the *Cytauxzoon* sp. sequences deposited in GenBank® from Spanish, French and Mongolian wild and domestic cats. Erythroparasitemia was observed mainly in apparently healthy cats. *Cytauxzoon* sp. infection was statistically associated with the colony group and the outdoor life style. No statistical association was found between positivity by PCR and breed, gender, age, presence of ticks and/or fleas, clinical status, laboratory findings such as anemia, FIV and/or FeLV status and mortality rate. Persistence of the infection was monitored and documented in four clinical cases. We reported the first clinicopathological description of naturally occurring *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats living in Italy. The predominance of subclinical erythroparasitemia and the evidence of persistent infection support the hypothesis that the domestic cat might serve as a reservoir host for this infection.

**Keywords:** *Cytauxzoon* sp. / domestic cat / PCR / clinicopathological findings

La presente ristampa è conforme alle regole editoriali della rivista.

## Introduction

Cytauxzoonosis is a tick-transmitted protozoal disease caused by *Cytauxzoon felis* affecting wild and domestic felids (Meinkoth and Kocan, 2005). It was described in several south central, south eastern (Meinkoth and Kocan, 2005), and mid-Atlantic states of the USA (Birkenheuer et al., 2006). The presumed main reservoir host of this infection appears to be the wild felid bobcat (*Lynx rufus*) (Kocan et al., 1985). Ticks are considered the vector and transmission of *C. felis* by *Dermacentor variabilis* (Blouin et al., 1984) and *Amblyomma americanum* (Reichard et al., 2010) has been demonstrated experimentally. *C. felis* has an initial tissue phase where schizonts are present within macrophages lining blood vessels followed by an erythrocytic phase (Nietfeld and Pollock, 2002). Development of the schizogonous form is responsible for the severe and fatal disease (Nietfeld and Pollock, 2002).

In domestic cats, natural and experimental infections have led to a rapid course of illness and death, usually in fewer than five days (Greene et al., 2006). The most common clinicopathological findings are anemia, depression, anorexia, vomiting, icterus, splenomegaly, hepatomegaly and high fever (Birkenheuer et al., 2006). Hypothermia typically develops just prior to the death (Greene et al., 2006). Historically, it was thought that the disease was always fatal in domestic cats. However, survival after infection (Walker and Cowell, 1995) and persistent blood parasitemia without clinical illness (Brown et al., 2008; Brown et al., 2010) have been documented in a few cases. In contrast, wild felids rarely manifest clinical illness and generally develop a subclinical erythroparasitemia (Meinkoth and Kocan, 2005). Nevertheless, occasional cases of fatal cytauxzoonosis, with clinical signs and large schizont-filled macrophages within blood vessels, have been reported also in wild felids (Garner et al., 1996; Nietfeld and Pollock, 2002; Peixoto et al., 2007).

*C. felis* has been suspected in countries other than United States. Microscopic identification of piroplasms were reported in a captive Bengal tiger from Germany infected presumably from three bobcats that had been imported from the USA about a year earlier, (Jakob and Wesemeier, 1996), and in domestic cats in Brazil (Mendes-de-Almeida et al., 2007).

Interestingly, in the last years, other species of *Cytauxzoon* infecting wild and domestic felids have sporadically been described. A new species of *Cytauxzoon* named *Cytauxzoon manul* (*C. manul*) was molecularly characterized from a Pallas' cat imported into Oklahoma from Mongolia (Ketz-Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005). Moreover, molecular recognition of a *Cytauxzoon*-like parasite was documented in a domestic cat (Criado-Fornelio et al., 2004) and Iberian Lynx from Spain (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007, 2009). Recently, *Hepatozoon canis* and *Cytauxzoon* sp. co-infection has been described in a cat from France (Criado-Fornelio et al., 2009). Unfortunately, there is paucity of information about epidemiological and clinicopathological aspects of infection by species of *Cytauxzoon* other than *C. felis*. The present manuscript describes a series of clinical infections with *Cytauxzoon* sp. in cats from Trieste, northeastern Italy. A cross-sectional study was carried out to investigate the presence of *Cytauxzoon* sp. infection in a population of cats in Trieste and to assess clinicopathological findings and variables associated with this infection.

## Material and methods

### Study area

The study was carried out in Trieste (45° 38' N, 13° 48' E) a seaport city (211 km<sup>2</sup>) in northeastern Italy. It is situated towards the end of a narrow strip of land lying between the Adriatic Sea and Italy's border with Slovenia, which lies almost immediately south, east and north of the city (<http://en.wikipedia.org/wiki/Trieste>). The wild animals present in the Trieste's area include roe deer, foxes, wild boars, hedgehogs (Zucca et al., 2003), and Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) (Molinari et al., 2006).

### Cats

Diagnosis of *Cytauxzoon* sp. infection was initially made by blood smear examination, PCR and sequencing in three cats (Cats nos. 1, 2, 3). Subsequently, *Cytauxzoon* sp. infection was investigated in a convenience cat population (n=115) divided into group 1 (colony cats, n=63) and group 2 (owned cats, n=52).

### *Clinical cases*

Diagnosis of *Cytauxzoon* sp. infection by microscopic evaluation of blood smear, 18S rRNA PCR analysis (Carret et al., 1999) and sequencing was made between February and June 2008. Cat nos. 1 and 3 were from Trieste, while cat no. 2 lived in Udine (near Trieste) but was adopted from a Trieste's colony 1 year before the diagnosis. Signalment, clinical history, physical examination, serial laboratory test including complete blood count (CBC), biochemical profile, serum protein electrophoresis (SPE), hemostatic profile and urinalysis, medical treatment and follow-up including outcome (survival *versus* nonsurvival) were recorded and evaluated. Other diagnostic tests such as detection of feline leukaemia virus (FeLV) antigen and feline immunodeficiency virus (FIV) antibodies were also assessed. PCR analysis from blood samples for detection of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus* *Mycoplasma turicensis* (Willi et al., 2005, 2006), *Hepatozoon* sp. (Inokuma et al., 1999), *Bartonella henselae* (Anderson et al., 1994), *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* (Solano-Gallego et al., 2006) were also performed as previously described. When tissue samples were available, PCR was performed from DNA extracted from paraffin-embedded tissues.

Cats (n=11) cohabitating with cat no. 2 were screened for *Cytauxzoon* sp. by CBC, blood smear evaluation and PCR analysis. However, these cats were not included in group 2 (owned cats) because they lived in the town of Udine (near Trieste).

### *Group 1 (colony cats).*

Sixty-three free-roaming apparently healthy cats anesthetized for spay or neuter in a feline population control effort between June 2008 and April 2009 were enrolled. The cats were born and have lived their entire life in cat colonies. A total of 15 cat colonies were studied and 12 colonies were located within Trieste and three colonies near the town (Fig. 1).

The colony from which cat no. 2 was adopted was also included in the study. Signalment, limited clinical history and physical examination were recorded. K<sub>3</sub>EDTA blood samples were taken. Blood smears were performed for all the cats, while a CBC was available for only 55 cats. The *Piroplasmidae* 18S rRNA gene PCR analysis (Carret et al., 1999) was carried out on DNA extracted from all blood samples. The detection of FIV antibody and FeLV p27 antigen were done by commercial ELISA tests (n=48) (ViraCHEK®/FIV and ViraCHEK®/FeLV, Synbiotics Corporation®) (Pinches et al., 2007a). Real-time

PCR analysis for detection of FIV and FeLV infections (n=15) were performed as previously described (Goto et al., 2000; Pinches et al., 2007b).

#### *Group 2 (owned cats)*

Fifty-two owned cats subjected to routine blood screening for various medical reasons in several veterinarian practices from Trieste were enrolled between June-August 2008 and February-April 2009. Signalment and clinical history were recorded when available. K<sub>3</sub>EDTA blood samples were taken and CBCs, blood smears and *Piroplasmidae* 18S rRNA gene PCR (Carret et al., 1999) were performed for all the cats. Serum samples were taken in the majority of cases (n=46) for biochemical profile and serum protein electrophoresis (SPE).

The detection of FIV and FeLV infections were assessed by means of ELISA tests (n=51) (Pinches et al., 2007a) and by PCR (n=1) (Goto et al., 2000; Pinches et al., 2007b).

#### **Routine laboratory tests**

CBC was performed by automatic cell counters (ADVIA<sup>®</sup>,120 and ADVIA<sup>®</sup> 2120, Bayer) in conjunction with evaluation of blood smears stained by the modified Wright technique (Aerospray slide stainer 7120, Delcon<sup>®</sup>). All samples were analyzed within 24h after collection.

The degree of parasitemia was evaluated by microscopy in X1000 magnification scanning the entire optimal area for evaluation of the blood film in which erythrocytes are close together with approximately one half touching each other (monolayer) (Harvey, 2001). Erythroparasitemia was graded with the following scale per entire monolayer: mild (1-5 erythrocytes parasitized), moderate (6-20 erythrocytes parasitized), marked (21-50 erythrocytes parasitized) and very marked (>50 erythrocytes parasitized). The other laboratory tests were carried out with slight modifications as previously described (Furlanello et al., 2005). Some of the laboratory parameters evaluated included: RBC, white blood cells concentration (WBC), reticulocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils, platelets concentration,  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT), total bilirubin, total protein, albumin, globulin, urea, creatinine, glucose, serum amyloid A,  $\alpha$ 1-globulins and  $\beta$ -globulins.

## **DNA extraction, Piroplasmidae 18S rRNA gene PCR, sequencing and phylogenetic analysis**

DNA extraction was performed from EDTA blood by the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol with some modifications. Two hundred  $\mu\text{L}$  of blood were incubated with 40  $\mu\text{L}$  of proteinase K and with 200  $\mu\text{L}$  of binding buffer at 72° C for 1h. Subsequent steps were carried out according to the manufacturer's instruction (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). DNA was eluted in 50  $\mu\text{L}$  of elution buffer at 72° C.

DNA extraction was performed from paraffin-embedded tissues samples from cat no. 1. Five to 10  $\mu\text{m}$  sections of paraffin-embedded tissue were placed in 200  $\mu\text{L}$  of binding buffer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The samples were incubated for 10 min at 95° C and then centrifuged for 20 min at 12000  $\times$  g. Subsequently, the samples were incubated at 65° C overnight in the presence of 4  $\mu\text{L}$  of proteinase-K (20 mg/mL) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and then processed according to manufacturer's instruction. To evaluate the efficacy of DNA extraction in processed samples, all DNA samples obtained from paraffin-embedded tissues were analyzed by using a real-time PCR for Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) as a housekeeping gene (Solano-Gallego et al., 2007).

A part of the 18S rRNA gene of *Piroplasmidae* species of approximately 412 bp was amplified by conventional PCR as previously described (Carret et al., 1999). Amplicons were visualized by UV transillumination after electrophoresis of 5  $\mu\text{L}$  of the reaction solution in a 2.2% agarose FlashGel DNA cassette (Cambrex Bioscience, Rockland USA).

During DNA extraction, two tubes containing phosphate buffer Solution were processed in parallel with every 20 samples to detect any genomic DNA contamination. The DNA obtained was processed during PCR assay. Negative control tube, containing 2.5  $\mu\text{L}$  of sterile water was also included in each PCR experiment to detect any contamination. A single positive control tube (2.5  $\mu\text{L}$  of purified *Babesia canis* genomic DNA) was included in each PCR experiment.

Seven positive PCR samples (cat nos. 1-3, two cats from group 1 and two cats from group 2) were used for restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with the *Hinf*I and *Taq*I restriction enzymes as previously described (Carret et al., 1999) and for direct sequencing. The sequencing was performed by an Applied Biosystem 3730xI DNA Analyzer on both strands by BMR Genomics srl (Padua, Italy) by using the dideoxychain-termination

method (Sanger et al., 1977). Consensus sequence was compared to the sequences deposited in GenBank® using the basin local alignment search tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A nucleotide-nucleotide BLAST search (blastn) was performed using the default settings.

Nucleotide sequence alignments were generated using ClustalW in the BioEdit software package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). For phylogenetic analysis, partial 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* sp. from the described cats were aligned with *C. felis* sequences, and other related feline and canine piroplasms sequences retrieved from GenBank®. The phylogenetic tree was constructed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4.0 (Tamura et al., 2007).

### **Statistical analysis**

Non-parametric tests (chi-square or Fisher's exact test) for univariate analysis were used to test for associations between proportions and putative explanatory factors such as age, breed, life style, presence of ticks/fleas, clinical status, FeLV/FIV co-infection, laboratory findings and mortality rate, when appropriate. For the purpose of statistical analysis, cats nos. 1-3 were included in group 2 (owned cats). The agreement between blood smear examination and PCR for *Cytauxzoon* sp. was evaluated by Kappa statistic. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . All the statistical tests were calculated with SPSS software (SPSS for Windows, rel. 12.0.1 2003; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **Results**

### **Cats**

#### *Clinical cases*

The signalment, history, life style and clinical signs of the first three clinical cases are summarized in Table 1. Blood smear evaluation in all the patients revealed small round to oval signet ring organisms of 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  of diameter inside the RBC, frequently individual but sometimes in pairs with an eccentric basophilic nucleus and a lightly basophilic cytoplasm (Fig. 2). These microorganisms were suggestive of *Cytauxzoon* sp., *Theileria* sp. or small form *Babesia* sp. The degree of parasitemia was moderate for cats no. 1 and no. 2 and

mild for cat no. 3. The three samples were positive for *Piroplasmidae* and negative to the other pathogens by PCR assays.

These cats were monitored by serial laboratory tests and the relevant laboratory findings are summarized in Table 2. During the follow up, intraerythrocytic parasites were persistently observed on blood smear evaluation in all the cats. Cat no.1 developed hemolytic anemia with an initial normal RBC value of  $6.83 \times 10^6/\mu\text{L}$  that decreased to a value of  $1.48 \times 10^6/\mu\text{L}$ . Regeneration varied from absent to moderate but was mainly low (aggregate reticulocytes mean  $\pm$  S.D. of  $51410 \pm 64761/10^6/\mu\text{L}$ ). Total bilirubin value was initially 0.14 mg/dL and increased to 0.57 mg/dL on day 25 while the urinary bile acids creatinine ratio was within normal limits during all the follow-up period (25 days).

In spite of the therapy, cat nos. 1 and 3 were euthanized due to the lack of clinical improvement. Necropsy was performed only in cat no. 1 and no macroscopical lesions were found. However, the histopathological findings observed were: splenic diffuse vascular congestion, with hyperplasia of germinative follicles and extramedullary hematopoiesis, hypercellular bone marrow with mild myeloid hyperplasia and focal lymphocytic infiltrate, mild aspecific and scattered lymphoplasmacytic enteritis, mild lymphoplasmacytic interstitial nephritis, hepatic lipidosis of centrilobular hepatocytes and mesenteric lymph nodes with hyperplasia of germinative follicles, increased plasma cells and macrophages in the sinus area. Large mononuclear cells with intracytoplasmatic parasites typical of developing stages of *C. felis* (Nietfeld and Pollock, 2002) were not encountered in any tissue. The absence of *Cytauxzoon* sp. in the cat at the time of euthanasia was further confirmed by negative *Piroplasmidae* PCR and positive GAPDH PCR results from all paraffin embedded tissues. PCR analysis performed on a blood sample taken from cat no. 1 at the time of euthanasia resulted positive for *Cytauxzoon* sp. while erythrocytic inclusions were not observed on blood smear evaluation.

Cat no. 2 was monitored for a period of 288 days (Table 2) and the small piroplasmids were persistently detected throughout the period approximately every 2-4 weeks by blood smear evaluation and PCR. Blood and bone marrow smears and stored frozen blood samples obtained on November 2007 at the San Marco Private Clinic (Padua, Italy) prior to the diagnosis of *Cytauxzoon* sp. infection were retrospectively analyzed. *Cytauxzoon* sp. was microscopically detected in RBC on blood and bone marrow smears and *Piroplasmidae* PCR of frozen stored blood sample was positive. Therefore, this patient was



persistently infected for at least 1.3 years. All cats cohabitating with cat no. 2 were negative for *Cytauxzoon* sp. by blood smear and PCR evaluations.

Cat no. 3 was tested by CBC, blood smear evaluation and PCR 2 days before euthanasia and *Cytauxzoon* sp. infection was detected by both techniques.

#### *Group 1 (colony cats)*

Signalment, clinical parameters, haematological findings and FIV/FeLV test results of infected cats from group 1 are included in Table 3. Age of infected cats ranged from 0.7 to 4 years (mean±SD=1.6±1.1) and age of non-infected cats ranged from 0.6 to 13 years (mean±SD=2.5±2.9). Parasites were detected by blood smear examination in 15 out of 63 cats (23.8%; confidence interval (CI) 95% 13.3%-34.3%) while *Piroplasmidae* PCR was positive in 19 out 63 cats (30.2%, CI 95% 18.8%-41.5%). The degree of parasitemia was mild (n=12) and moderate (n=3). Infected cats were present in the majority of colonies studied.

#### *Group 2 (owned cats)*

Signalment, clinical parameters, some laboratory findings and the FIV/FeLV status of infected cats from group 2 are included in Table 3. *Cytauxzoon* sp. infection was diagnosed by PCR in 5/52 (9.6%; C95% 1.6-17.6%) of the cats. Age of infected cats ranged from 5 to 12 years with a mean±SD of 9.5±2.7 and age of non-infected cats ranged from 1 to 17 years with a mean±SD of 1.3±5.5. Clinical information was available for four infected cats. They were affected by hyperthyroidism and lymphoma treated by chemotherapy (n=1), renal failure (n=1), and chronic diarrhoea (n=2). Three cats were still alive and one cat died of unknown cause at the time of writing this manuscript. Interestingly, four out of five owned infected cats came from a Trieste feline colony. Parasites were not detected by routine blood smear examination in any cats. Seven weeks after the initial diagnosis, one infected cat was monitored by CBC, blood smear evaluation and PCR. PCR remained positive and parasites were seen on blood smear for the first time.

### **DNA sequencing, RFLP and phylogenetic analysis**

The seven positive PCR samples analyzed by RFLP were not digested by the restriction enzymes as *Babesia canis* DNA (Carret et al., 1999). The DNA

sequences obtained from these samples were identical to each other, and 99% identical to the *Cytauxzoon* sp. sequences (Fig. 3) present in GenBank®. The highest identity was obtained with *Cytauxzoon* sp. 18S rDNA partial sequences reported in Spanish (Criado-Fornelio et al., 2004; Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007), French (Criado-Fornelio et al., 2009) and Mongolian (Ketz-Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005) wild and domestic felids (Fig. 3). In contrast, the sequences revealed an identity of only 93% with *C. felis* deposited in GenBank®. The seven new *Cytauxzoon* sp. nucleotide sequences were deposited in the GenBank® database with accession numbers HM146422 to HM146428.

The phylogenetic analysis (Fig. 3) revealed the presence of four principal clades, well supported by high bootstrap value, formed by *Cytauxzoon* sp., *C. felis*, *Theileria* sp. and *Babesia* sp. The major clade included the *Cytauxzoon* sp. sequences obtained in the present work and sequences deposited in GenBank® as *Cytauxzoon* sp. and *C. manul* found in Spanish, French and Mongolian felids. The monophyletic group, formed by both species of *C. felis*, from domestic and wild felids, is supported by a high bootstrap value and is placed as a sister group of the *Cytauxzoon* sp. clade. The phylogenetic analysis showed that *Cytauxzoon* sp. was clearly separated from the *Babesia* sp. and the *Theileria* sp. clades.

### Statistical analysis

*Cytauxzoon* sp. infection was significantly associated with the colony cats (group 1) ( $\chi^2=4.06$ ;  $P=0.04$ ) and with the outdoor life style ( $\chi^2=6.70$ ;  $P=0.04$ ). No statistical association was found between PCR positive results and breed, gender, age, presence of ticks and/or fleas, clinical status, laboratory findings such as anemia, FIV and/or FeLV status and mortality rate (Table 3).

A Kappa value of 0.73 was found between blood smear examination and PCR which demonstrated a good agreement (Landis and Koch, 1977).

### Discussion

The present study describes *Cytauxzoon* sp. infection for the first time in cats living in Trieste, northeastern Italy. Infection was demonstrated by both blood smear examination and molecular analysis. In previous studies, *Cytauxzoon* sp. piroplasm was only described by microscopic detection in Pallas' cats (Ketz-

Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005) and in Iberian lynx (Luaces et al., 2005) while it was sporadically detected only by molecular testing in domestic cats (Criado-Fornelio et al., 2004, 2009). The sequencing and the phylogenetic analysis performed on the 18S rRNA gene revealed that *Cytauxzoon* sp. detected in Italy in this study presented a high homology with isolates from Mongolian (Ketz-Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005), Spanish (Criado-Fornelio et al., 2004; Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007, 2009) and French (Criado-Fornelio et al., 2009) wild and domestic felids. These findings indicate that the parasites described in those reports and the *Cytauxzoon* sp. from Trieste are closely related and may belong to the same species. In agreement with our data, a close relationship between *C. manul* and Spanish *Cytauxzoon*-like parasite was reported (Reichard et al., 2005). Further molecular studies, on different genes more variable than 18S rRNA such as the internal transcribed spacer1 (ITS1) and ITS2 (Brown et al., 2009), are needed to further clarify the relatedness of the *Cytauxzoon* sp. described until now. In addition, we reported, for the first time, that primers used for canine *Babesia* species (Carret et al., 1999) detected piroplasm including *Cytauxzoon* sp. in cats.

Up to now, only sporadic cases of *Cytauxzoon* sp. infection have been described in Europe. These included four wild Iberian lynx (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007) and a domestic cat from Spain (Criado-Fornelio et al., 2004) and from France (Criado-Fornelio et al., 2009). The present study found widespread infection in a population of domestic cats living in the same city (Trieste, Italy). *Cytauxzoon* sp. infection was detected in 27/118 (23%) showing a high prevalence of this infection in cats for the first time in Europe. A similar prevalence rate (15%) was described in Iberian lynx in Spain (Millan et al., 2007). While infection was associated with clinical disease in some of the infected cats, subclinical infection was highly prevalent. These findings are in similarity to infection with *C. felis* recently reported in a population of domestic cats that were clinically healthy but at higher risk for parasite exposure in the USA with rates of infection up to 30% (Brown et al., 2010). In the USA, where *C. felis* infection is endemic, the prevalence of this infection in bobcats (*Lynx rufus*) varies between 7% and 33% and the level of bobcat infection is associated with living in a region where *C. felis* is recognized in domestic cats (Birkenheuer et al., 2008). Prevalence in free-ranging Florida panthers and Texas cougars was 35% and 39%, respectively (Rotstein et al., 1999), while only 9% of the free-ranging cougars in southern Florida have been found to be infected (Yabsley et al., 2006).

In this study, *Cytauxzoon* sp. infection was significantly associated with free ranging cats when compared with owned cats from the same city. The prevalence of infection in colony and owned cats was 30% and 10%, respectively. Free ranging cats appear to be at higher risk of this infection. This might be due to the fact that they can roam freely, be easily exposed to potential tick vectors and to wildlife reservoirs, and have a poor nutritional and clinical status including no preventative treatment against ectoparasites. Based on these findings, it is recommended to perform screening for *Cytauxzoon* sp. infection in cats from the Trieste area, particularly if they are from cat colonies. In addition, it would be advisable to screen blood donor cats for *Cytauxzoon* sp. infection to avoid a likely transmission by blood transfusion.

Persistence of erythroparasitemia was documented in four clinical cases in this study. Interestingly, the cats described in the present study lived in an urban area near wooded areas where the Eurasian lynx is present. In fact, the Eurasian lynx is found in northeastern Italy and Slovenia (Molinari et al., 2006). Consequently, European wild felids (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007) and free-ranging domestic cats might be considered as possible reservoirs of *Cytauxzoon* sp. due to the evidence of subclinical erythroparasitemia and persistence of infection as reported in North America for domestic cats (Brown et al., 2008; Brown et al., 2010) and other wild felids (Greene et al., 2006).

The transmission of *C. felis* infection from one domestic cat to another by *A. americanum* ticks confirms that these ticks are the primary vector for this infection (Reichard et al., 2010). However, the transmission of *C. felis* by *D. variabilis* remains controversial (Blouin et al., 1984; Reichard et al., 2010). Ticks previously reported for *C. felis* infection are not described in Italy, we hypothesize that *Ixodid* ticks commonly found in Italy, i.e. *Ixodes ricinus* or *Dermacentor* sp. (Di Todaro et al., 1999; Cassini et al., 2009) might be involved in the transmission of *Cytauxzoon* sp. infection. Other less likely modes of transmission include vertical transmission as reported for other piroplasms such as *Babesia gibsoni* in dogs (Fukumoto et al., 2005). Although the majority of infected colony cats were less than 1 year of age, there was no statistical association between infection and age. Interestingly, in a study involving Florida panthers and Texas cougars, one seven day old kitten infected by *C. felis* was identified (Rotstein et al., 1999). Further studies are needed to determine the prevalence, distribution, transmission and risk factors associated with this infection in wild and domestic cats in Europe.

Very little is known about the epidemiological and clinical aspects of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic and wild cats in Europe due to the fact that only sporadic molecular detection of this parasite has been described (Criado-Fornelio et al., 2004, 2009). In this study, no statistical association was found between PCR positivity and breed, gender, age, presence of ticks and/or fleas, clinical status, laboratory findings such as anemia, FIV and/or FeLV status and mortality rate. In agreement with our results, Pallas' cats infected with *C. manul* tested by hematology, serum biochemistry profiles and serology for FIV, FeLV, feline peritonitis virus and *Toxoplasma gondii* infections were not found to have any association between infection and abnormal findings with these assays (Ketz-Riley et al., 2003). In contrast, normocytic, normochromic, nonregenerative anemia (Greene et al., 2006) is a common finding during cytauxzoonosis by *C. felis* and develops relatively late in the course of the disease but may become profound near death (Meinkoth and Kocan, 2005). In this study, only eight cats (cat no. 2, five colony cats, and two owned cats) presented anemia at the time of the diagnosis. Previously, decreased hematocrit and haemoglobin values were described in a Spanish *Cytauxzoon* sp. infected cat (Criado-Fornelio et al., 2004).

Interestingly, the majority of infected cats appear healthy showing only a low level of erythroparasitemia sporadically associated to anemia while few severe clinical cases with laboratory abnormalities were also found. In addition, schizogonic forms in different tissues were not found on histopathological and molecular evaluation in cat no.1 despite a fatal disease, in contrast to what is found in acute *C. felis* infection where schizogonic forms in macrophages are observed (Meier and Moore, 2000; Peixoto et al., 2007). Further studies are needed to investigate the life cycle of *Cytauxzoon* sp. infection. Based on these present findings, it is likely that *Cytauxzoon* sp. infection is mainly subclinical in the majority of cats and it might be less virulent than *C. felis* infection described in domestic cats in the USA. Only when other pathologies (i.e. lymphoma) or immune suppressive events (stress, corticosteroid therapy or FIV/FeLV infections) occur, *Cytauxzoon* sp. might be more pathogenic causing mild to severe disease in cats as described for other pathogens such as hemoplasmas (Tanahara et al., 2010). The clinical course that occurs with this pathogen needs further investigation.

In conclusion, this is the first report of widespread *Cytauxzoon* sp. infection, which is different from *C. felis*, in a population of domestic cats in Europe. Infection was sub-clinical in the majority of infected cats and was associated

with clinical disease in only seven cats. It remains unclear whether clinical disease was related or unrelated to the presence of infection with the *Cytauxzoon* sp. Therefore, the pathogenic role of this parasite remains unknown. Infection was associated with an outdoor life style and living in a cat colony. The high prevalence of *Cytauxzoon* sp. infection in cats from Trieste may indicate a hyperendemic focus of infection in this city. The predominance of subclinical erythroparasitemia and the evidence of persistence of the infection support the possibility that the domestic cat may serve as reservoir host for *Cytauxzoon* sp. infection but does not rule out the possibility of a wildlife reservoir.

### Acknowledgments

The authors are grateful to the referring veterinarian colleagues especially to Dr. Coz and to the San Marco laboratory staff with special attention to Dr. Martina Nicetto for molecular technical support and Dr. Carlo Masserdotti for cytological and histopathological support. The authors thank Professor Gad Baneth, Dr. Gioia Capelli and Professor Mario Pietrobelli for helpful discussions and input in the manuscript.

### References

- Anderson, B., Sims, K., Regnery, R., Robinson, L., Schmidt, M.J., Goral, S., Hager, C., Edwards, K., 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. J. Clin. Microbiol. 32 (4), 942-948.
- Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998-2004). J. Am. Vet. Med. Assoc. 228 (4), 568-571.
- Birkenheuer, A.J., Marr, H.S., Warren, C., Acton, A.E., Mucker, E.M., Humphreys, J.G., Tucker, M.D., 2008. *Cytauxzoon felis* infections are present in bobcats (*Lynx rufus*) in a region where cytauxzoonosis is not recognized in domestic cats. Vet. Parasitol. 153 (1-2), 126-130.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Glenn, B.L., Kocan, K.M., Hair, J.A., 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). J. Wildl. Dis. 20 (3), 241-242.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Glenn, B.L., Kocan, K.M., 1987. Evidence of

- a limited schizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *J. Wildl. Dis.* 23 (3), 499-501.
- Brown, H.M., Berghaus, R.D., Latimer, K.S., Britt, J.O., Rakich, P.M., Peterson, D.S., 2009. Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21 (1), 59-63.
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O., Peterson, D.S., 2008. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20 (4), 485-488.
- Brown, H.M., Lockhart, J.M., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2010. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. *Vet. Parasitol.* 172 (3-4), 311-316.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (3), 298-303.
- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165 (1-2), 30-35.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159 (1), 73-76.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119 (4), 337-345.
- Di Todaro, N., Piazza, C., Otranto, D., Giangaspero, A., 1999. Ticks infesting domestic animals in Italy: current acarological studies carried out in Sardinia and Basilicata regions. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 39-40.
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., Xuan, X., 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.* 35 (9), 1031-1035.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134 (1-2), 77-85.
- Garner, M.M., Lung, N.P., Citino, S., Greiner, E.C., Harvey, J.W., Homer, B.L., 1996. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Vet. Pathol.* 33 (1), 82-86.

- Goto, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Endo, Y., Baba, K., Momoi, Y., Watari, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H., 2000. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 61 (12), 1609-1613.
- Greene, C.E., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2006. Cytauxzoonosis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and the Cat*. Saunders, St. Louis, pp. 716-722.
- Harvey, J.W., 2001. Examination of blood sample. In: Harvey, J.W. (Ed.), *Atlas of Veterinary Hematology*. Saunders, Philadelphia, pp. 3-20.
- Inokuma, H., Ohno, K., Yamamoto, S., 1999. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 61 (10), 1153-1155.
- Jakob, W., Wesemeier, H.H., 1996. A fatal infection in a Bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *J. Comp. Pathol.* 114 (4), 439-444.
- Ketz-Riley, C.J., Reichard, M.V., Van den Bussche, R.A., Hoover, J.P., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2003. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.* 39 (2), 424-430.
- Kocan, A.A., Blouin, E.F., Glenn, B.L., 1985. Hematologic and serum chemical values for free-ranging bobcats, *Felis rufus* (Schreber), with reference to animals with natural infections of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979. *J. Wildl. Dis.* 21 (2), 190-192.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33 (2), 363-374.
- Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J. Wildl. Dis.* 41 (4), 810-815.
- Meier, H.T., Moore, L.E., 2000. Feline cytauxzoonosis: a case report and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 36 (6), 493-496.
- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., 2005. Feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 35 (1), 89-101.
- Mendes-de-Almeida, F., Labarthe, N., Guerrero, J., Faria, M.C., Branco, A.S., Pereira, C.D., Barreira, J.D., Pereira, M.J., 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus Linnaeus*, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 147 (1-2), 9-15.
- Millan, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodriguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almeria, S., Leon-Vizcaino, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 182 (1), 114-124.



- Millan, J., Naranjo, V., Rodriguez, A., de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134 (Pt 7), 995-1001.
- Molinari, P., Bionda, R., Carmignola, G., Catello, M., Cetto, E., Filacorda, S., Gavagnin, P., Mingozzi, T., Rodolfi, M., Molinari-Jobin, A., 2006. Status of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the Italian Alps: an overview 2000-2004. *Acta Biologica Slovenica* 49, 13-18.
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 38 (3), 607-610.
- Peixoto, P.V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., Franca, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.* 145 (3-4), 383-387.
- Pinches, M.D., Diesel, G., Helps, C.R., Tasker, S., Egan, K., Gruffydd-Jones, T.J., 2007a. An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. *Vet. Clin. Pathol.* 36 (2), 141-147.
- Pinches, M.D., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Egan, K., Jarrett, O., Tasker, S., 2007b. Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.* 9 (1), 8-13.
- Reichard, M.V., Edwards, A.C., Meinkoth, J.H., Snider, T.A., Meinkoth, K.R., Heinz, R.E., Little, S.E., 2010. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. *J. Med. Entomol.* 47 (5), 890-896.
- Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91 (2), 420-426.
- Rotstein, D.S., Taylor, S.K., Harvey, J.W., Bean, J., 1999. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *J. Wildl. Dis.* 35 (3), 613-617.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (12), 5463-5467.
- Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 147 (3-4), 315-319.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., 2006. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 515-518.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8), 1596-1599.
- Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, T., Yoshii, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Setoguchi, A., Endo, Y., 2010. An Epidemiological Survey of Feline Hemoplasma Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* .
- Walker, D.B., Cowell, R.L., 1995. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206 (9), 1363-1365.
- Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 44 (3), 961-969.
- Willi, B., Boretti, F.S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M.L., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 43 (6), 2581-2585.
- Yabsley, M.J., Murphy, S.M., Cunningham, M.W., 2006. Molecular detection and characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* species in cougars from Florida. *J. Wildl. Dis.* 42 (2), 366-374.
- Zucca, P., Oberosler, R., Benussi, E., 2003. Recupero di fauna selvatica nella provincia di Trieste nel triennio 1993-1996 (*Mammalia-Aves*). *J. Mr. Ecol.* 7, 295-298.

Table 1 Signalment, clinical history, clinical signs at the time of diagnosis, concurrent pathological conditions and treatment and follow-up in first three clinical cases

Cat and signalment <sup>a</sup>	History and life style <sup>b</sup>	Clinical history <sup>c</sup>	Clinical signs at the time of the diagnosis	Concurrent pathological conditions <sup>d</sup>	Therapy and follow up <sup>b, e</sup>
Cat no. 1: D, F, 8 yr	ATC, IVEP, IN, no ETF	<ul style="list-style-type: none"> <li>December 2007-January 2008: ulcerative crusting dermatitis with pruritus on the neck and the pinnae treated with antimicrobial therapy and <i>P</i> without improvement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>February 2008: diarrhoea, vomiting, weight loss, frequently seclusion, ulcerative crusting dermatitis on the neck and the pinnae and underweight</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>FIV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>ID</i> and <i>E</i> (day 5<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup>); <i>BT</i>, <i>DOX</i> and <i>AZM</i> (day 18<sup>th</sup>, recovered to San Marco hospital); <i>AT</i> (day 21<sup>st</sup>);</li> <li>Worsen clinical and laboratory conditions and euthanasia (day 25<sup>th</sup>)</li> </ul>
Cat no. 2: D, M, 4 yr	ATC, IN/OUT	<ul style="list-style-type: none"> <li>April-November 2007: relapsing anemia, jaundice and CKD after teeth extraction for stomatitis</li> <li>May 2008: explorative laparotomy for suspected pancreatitis and then anemia and hyperbilirubinemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>May 2008: lethargy and fever (41°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CKD</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>AZM</i>, <i>E</i> and <i>P</i> and monitored the patient with serial CBCs</li> <li>The cat is still alive receiving a <i>P</i> every 2 days and cycle of <i>DOX</i> for 10 days every month and his clinical condition remains good</li> </ul>
Cat no. 3: D, F, 14 yr	IVEP, IN/OUT, ETF	<ul style="list-style-type: none"> <li>April-June 2008: episodes of anorexia, seclusion, refusal to move, stomatitis and hypothermia resolved with <i>E</i> and <i>P</i> therapy.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>June 2008: staggering, circling and vocalizations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>None</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>AZM</i> and <i>ID</i> (day 7<sup>th</sup>) instituted without improvement</li> <li>Euthanasia (day 17<sup>th</sup>)</li> </ul>

<sup>a</sup>D: domestic shorthair, F: female, M: male; <sup>b</sup>ATC: adopted from town colony; IVEP: irregular vaccination/ectoparasites preventative; IN: indoor life; ETF: exposed to ticks and/or fleas; OUT: outdoor life <sup>c</sup>*P*: prednisone (immune suppressive dose), CKD: chronic kidney disease, *E*: enrofloxacin <sup>d</sup>FIV: feline immunodeficiency virus. <sup>e</sup>*ID*: imidocarb dipropionate, *BT*: blood transfusion, *DOX*: doxycycline, *AZM*: azithromycin, *AT*: atovaquone

Table 2 Summarized laboratory findings at the time of diagnosis, during follow-up and day of death in first three clinical cases

	Cat no.1			Cat no.2		Cat no.3		
Total follow up period (days)	25			288		15		
Parameters (Reference interval) <sup>a</sup>	Diagnosis	Death	Maximum -minimum <sup>b</sup>	Diagnosis	Maximum -minimum <sup>b</sup>	Diagnosis	Death	maximum -minimum <sup>b</sup>
<u>CBC</u>		n=8			n=16		n=3	
RBC (6.35-9.5*10 <sup>6</sup> /μL)	6.83	1.48	6.83-1.39	4.17	9.76-3.77	9.87	8.87	9.87-8.87
AARC (15-81*10 <sup>3</sup> /μL)	/	50.32	180.6-1.44	/	/	/	/	/
WBC (5-11*10 <sup>3</sup> /μL)	6.1	8.2	8.2-4.54	35.2	35.2-15.7	6	6.29	17.54-6
PLT (130-430*10 <sup>3</sup> /μL)	784	245	784-161	606	606-184	252	265	265-211
<u>BIOCHEMICAL PROFILE</u>		n=4			n=3		n=2	
GGT (0.1-0.6 UI/L)	0.5	1.9	1.9-0.5	1.5	1.5-0.5	0.4	0.5	0.5-0.4
TB (0.14-0.26 mg/dL)	0.14	0.57	0.57-0.14	0.29	0.29-0.21	0.18	0.19	0.19-0.18
BUN (32-64 mg/dL)	97	73	97-40	87	107-87	57	44	57-44
CREAT (0.95-1.85 mg/dL)	1.4	1.18	1.4-1.18	2.16	2.8-2.16	1.47	1.27	1.47-1.27
G (86-116 mg/dL)	128	128	133-122	150	150-67	147	139	147-139
SAA (0.1-0.5 μg/mL)	1.4	48.1	48.1-0.1	0.1	0.4-0.1	0.1	0.3	0.3-0.1
<u>SPE</u>		n=5			n=3		n=3	
α1-globulins (0.8-1.6%)	3	2	3.2-1.5	0.8	3.1-0.8	0.7	1.7	6.4-0.7
β-globulins (6.4-9.4%)	10.2	10.8	11-9.9	11.8	11.8-11.1	12.1	9.5	13.6-9.5

<sup>a</sup>RBC: Red Blood Cells, AARC: Absolute Aggregate Reticulocytes Concentration, WBC: White Blood Cells, PLT: platelet concentration, GGT: γ-Glutamyltransferase, TB: Total Bilirubin, BUN: Blood Urea Nitrogen, CREAT: creatinine, G: glucose, SAA: Serum Amyloid A, SPE: Serum Protein Electrophoresis. <sup>b</sup>Maximum and minimum values at the time of diagnosis and during follow-up

Table 3. Clinical parameters and relevant laboratory findings of all cats studied

Clinical Parameters	Number of infected cats	Number of noninfected cats	$\chi^2$	P value
AGE (n=104)				
▪ Young (n=43)	14 (33%)	29 (67%)		
▪ Adult (n=42)	10 (24%)	32 (76%)	2.10	0.35
▪ Old (n=19)	3 (16%)	16 (84%)		
BREED (n=104)				
▪ DSH (n=97)	26 (27%)	71 (73%)		
▪ DLH (n=1)	0	1 (100%)	0.66	0.72
▪ Other (n=6)	1 (17%)	5 (83%)		
GENDER (n=104)				
▪ Male (n=38)	9 (24%)	29 (76%)		
▪ Female (n=66)	18 (27%)	48 (73%)	0.16	0.69
GROUP (n=118)				
▪ Owned cats (n=55)	8 (15%)	47 (85%)		
▪ Colony cats (n=63)	19 (30%)	44 (70%)	4.06	0.04
LIFE STYLE (n=75)				
▪ Indoor (n=4)	0 (0%)	4 (100%)		
▪ Outdoor (n=62)	19 (31%)	43 (69%)	6.70	0.04
▪ Indoor/Outdoor (n=9)	6 (67%)	3 (33%)		
FLEAS (n=68)				
▪ Present (n=5)	1 (20%)	4 (80%)		
▪ Absent (n=63)	22 (35%)	41 (65%)	0.46	0.5
CBC (n=110)				
ANEMIA				
▪ Absent (n=84)	19 (23%)	65 (77%)		
▪ Present (n=26)	8 (31%)	18 (69%)	0.71	0.4
LEUCOCYTES				
▪ Normal (n=37)	7 (19%)	30 (81%)		
▪ High (n=65)	19 (29%)	46 (71%)	2.03	0.36
▪ Low (n=8)	1 (13%)	7 (87%)		
PLATELETS				
▪ Normal (n=80)	19 (24%)	61 (76%)		
▪ High (n=27)	8 (30%)	19 (70%)	1.38	0.50
▪ Low (n=3)	0	3 (100%)		
BIOCHEMICAL PROFILE				
CREATININE (n=50)				
▪ Normal (n=27)	3 (11%)	24 (89%)		
▪ High (n=19)	4 (21%)	15 (79%)	1.08	0.58
▪ Low (n=4)	1 (25%)	3 (75%)		
GLUCOSE (n=50)				
▪ Normal (n=17)	1 (6%)	16 (94%)		
▪ High (n=28)	7 (25%)	21 (75%)	3.94	0.14
▪ Low (n=5)	0	5 (100%)		
SAA (n=49)				
▪ Normal (n=30)	4 (13%)	26 (87%)		
▪ High (n=19)	4 (21%)	15 (79%)	0.51	0.48
SPE <sup>b</sup>				
A1 GLOBULINS (n=49)				
▪ Normal (n=21)	2 (10%)	19 (90%)		
▪ High (n=23)	5 (22%)	18 (78%)	1.25	0.53
▪ Low (n=5)	1 (20%)	4 (80%)		
FIV/FeLV STATUS (n=118)				

▪ FIV positive (n=12)	4 (33%)	8 (67%)	0.83	0.36
▪ FIV negative (n=106)	23 (22%)	83 (78%)		
▪ FeLV positive (n=6)	0	6 (100%)	1.88	0.17
▪ FeLV negative (n=112)	27 (24%)	85 (76%)		

---

<sup>a</sup>DSH: Domestic Shorthair, DLH: Domestic Longhair, Young: until 1 year; adult: 1-10 years; old: over 10 years; <sup>b</sup>SPE: serum protein electrophoresis; ND: not determined



Fig. 1. Map of the location (black and white spot) of 9 out colonies of 12 within Trieste (Italy).

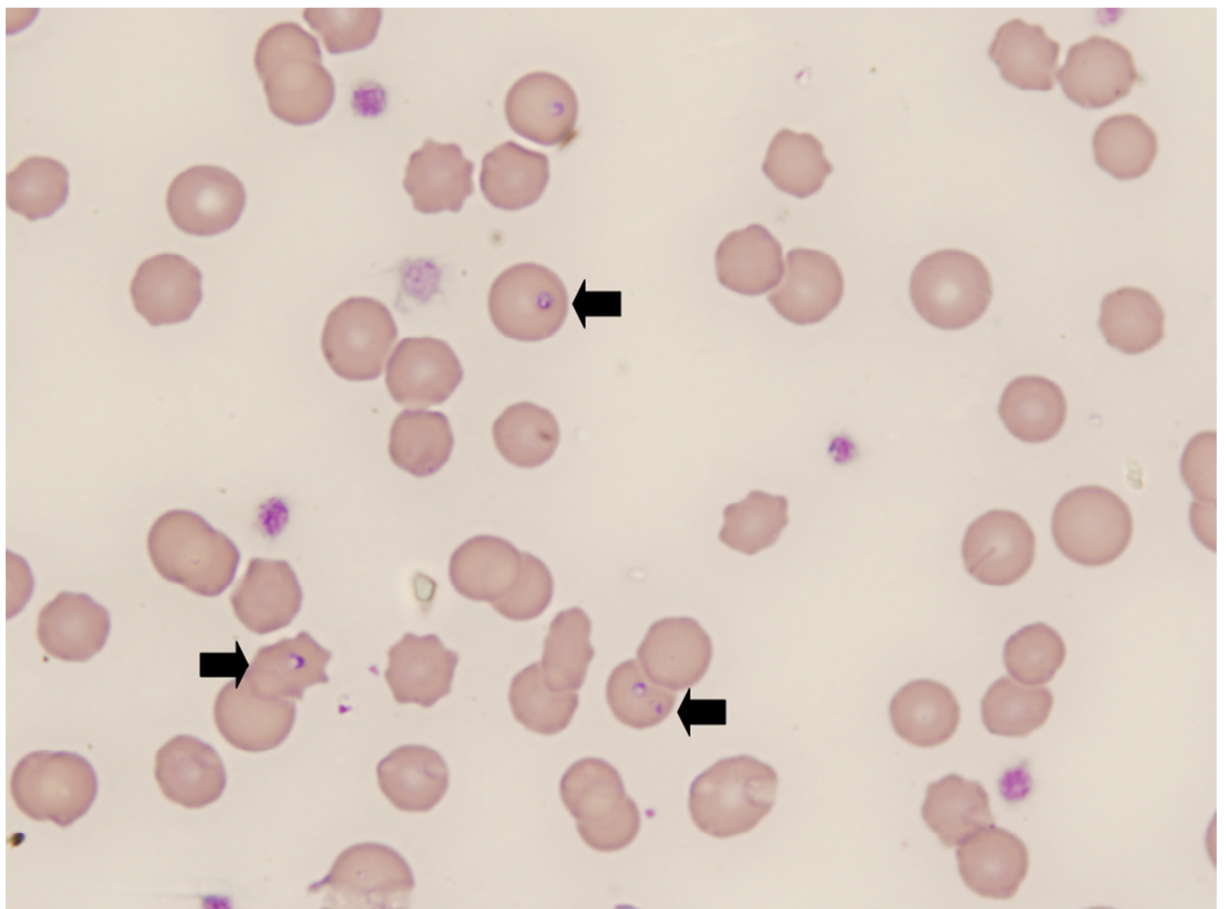


Fig. 2. Blood smear stained by the modified Wright stain showing *Cytospora* sp. parasites (arrows) in erythrocytes from cat no.1. X1000

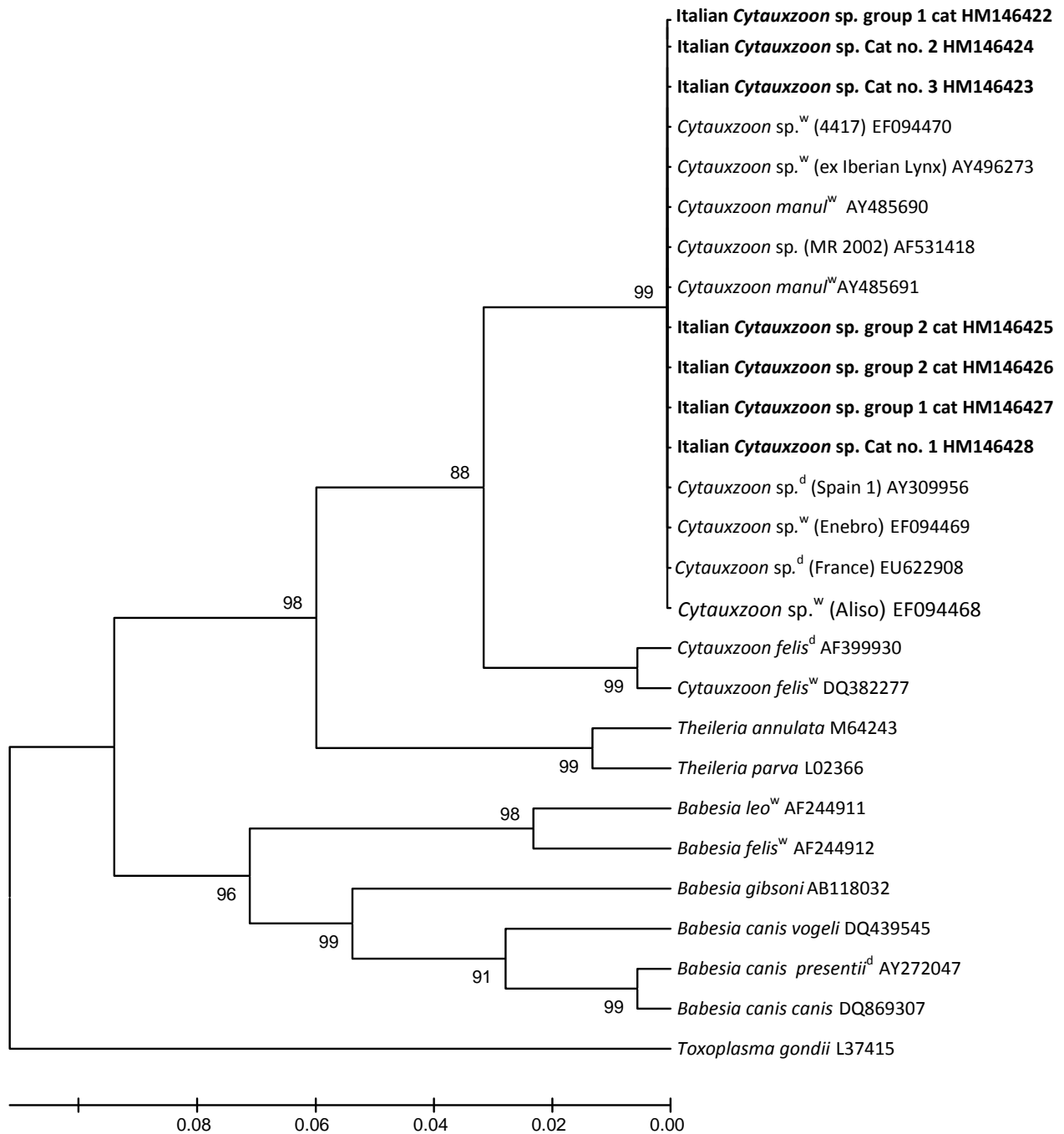


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on the partial 18S rRNA gene sequences of different piroplasms, including *Cytauxzoon*, *Babesia* and *Theileria* species from domestic (<sup>d</sup>) and wild (<sup>w</sup>) felids and seven sequences obtained in the present study (in bold). The GenBank® accession numbers are indicated after the strain description. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method, with Kimura 2-parameter model. The numbers represented the percentage of 1000 replicants (bootstrap support) for which the same branching patterns were obtained. The tree was constructed using *Toxoplasma gondii* as outgroup.



## *Capitolo Secondo*

*Cytauxzoon sp. infection in two free ranging young cats: clinicopathological findings, therapy and follow up*

Carli E, Trotta M, Bianchi E, Furlanello T, Caldin M, Pietrobelli M, Solano-Gallego L., 2013. Spedito a The Canadian Veterinary Journal

**Riassunto.** Due giovani gatti, entrambi maschi e appartenenti alla stessa cucciolata sono stati sottoposti a valutazione clinica per diarrea. All'osservazione dello striscio ematico, sono stati individuati piroplasmii in sede intraeritrocitaria. Solamente il primo gatto era anemico (anemia lieve, non rigenerativa). Un segmento del gene 18S rRNA è stato amplificato e sequenziato e ha mostrato un'omologia del 99% con *Cytauxzoon* sp. e del 93% con *Cytauxzoon felis*. Il primo gatto è stato trattato con doxiciclina e imidocarb dipropionato, è stato monitorato mediante esami di laboratorio seriali ed è risultato negativo all'infezione da *Cytauxzoon* sp. al termine della terapia (durata del follow up di 175 giorni). Il secondo gatto ha ricevuto il medesimo trattamento terapeutico ma la doxiciclina è stata interrotta dal proprietario dopo una settimana. Questo soggetto è stato monitorato per 130 giorni durante i quali è rimasto eritroparassitemico e asintomatico. In questo lavoro sono stati descritti, mediante dettagliati dati clinici, due casi d'infezione da *Cytauxzoon* sp. nei gatti domestici. Sono stati riportati, inoltre, due protocolli terapeutici e i relativi follow up con opposta risposta al trattamento (eliminazione del parassita *versus* persistenza dell'infezione).

**Abstract.** Two young brother male free ranging domestic shorthair cats were evaluated for diarrhoea. They presented intraerythrocytic piroplasms on blood smear evaluation. Only the first cat was anemic (mild non regenerative anemia). A partial segment of the 18S rRNA was amplified and sequenced revealing a homology of 99% with *Cytauxzoon* sp. and of 93% with *Cytauxzoon felis*. The first cat was treated with doxycycline and imidocarb dipropionate and monitored by serial laboratory exams resulting negative for *Cytauxzoon* sp. infection after the end of the therapy (follow up period of 175 days). The second cat received the same therapy but doxycycline was discontinued by the owner after one week. He was monitored for 130 days remaining erythroparasitemic and asymptomatic. We described cases of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats with detailed clinical data, description of two therapeutic protocols and follow-up after treatment with opposite parasitological response (parasitological cure versus persistence of infection).

**Key words:** *Cytauxzoon* sp., therapy, Italy, PCR analysis, domestic cat, young

## Introduction

Cytauxzoonosis is a tick transmitted protozoal disease affecting wild and domestic felids (Meinkoth and Kocan, 2005) caused by *Cytauxzoon felis* (*C. felis*) and reported mainly in the United States (Birkenheuer et al., 2006; Meinkoth and Kocan, 2005). A severe, often fatal disease was described in domestic felids (Meinkoth and Kocan, 2005; Jacson and Fisher, 2006) but cats surviving natural infection (Meinkoth et al., 2000) or infected and apparently healthy occur (Haber et al., 2007; Brown et al., 2008). To date, a specific treatment is not available.

*Cytauxzoon* sp. genetically similar to *C. felis* were identified in Pallas's cats from Mongolia (Ketz-Reley et al., 2003; Reichard et al., 2005), in a cat (Criado-Fornelio et al., 2004) and in Iberian lynx (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007) in Spain, in a cat in France (Criado-Fornelio et al., 2009) and in a feline population from a focus in the northeastern of Italy (Carli et al., 2012). The majority of the *Cytauxzoon* sp. infected cats were apparently healthy, low erythroparasitemic and sporadically anemic (Carli et al., 2012). Some cases with clinical illness and fatal development were described (Carli et al., 2012). To the author's knowledge, there is limited clinical and epidemiological information about this infection in Europe.

The present case report describes clinicopathological findings, diagnosis, therapy and follow up in two free ranging young cats naturally infected with *Cytauxzoon* sp. with opposite parasitological responses (parasitological cure versus persistence of infection).

## Materials and methods and results

### Case history

Cat no. 1 a six months old, male, domestic shorthair was referred to veterinarian for diarrhoea on October 2009. The cat was adopted from a colony living in Acquapendente (central Italy) (Figure 1). A massive infestation by ticks occurred in the area where he was born during the summer before his adoption. The cat had no history of vaccination and ectoparasiticides treatment. Only a corneal lesion was observed at physical examination. No ticks or fleas were found. *Toxocara* sp. eggs were detected on fecal microscopic examination. Complete blood count (CBC), biochemical profile and serum protein electrophoresis were assessed as previously described (Carli et al., 2012) at the

San Marco Laboratory, Padua within 24h after the collection. CBC was performed by automatic cell counter (ADVIA® 2120, Bayer) in conjunction with blood smear evaluation. Serial laboratory findings of cat no.1 are summarized on table 1. Mild non regenerative anemia, mild leucocytosis, monocytosis and thrombocytosis were present. Intraerythrocytic piroplasms suggestive of *Cytauxzoon* sp., *Theileria* sp. or small form *Babesia* sp. were noted on blood smear evaluation (Figure 2). The parasitemia was classified as low grade (Carli et al., 2012).

DNA extraction was performed from EDTA blood by the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol with some modifications (Carli et al., 2012). A fragment of 18S rRNA gene of Piroplasmidae species of approximately 412 bp was amplified by conventional PCR (Carret et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2008; Carli et al., 2012). Then, positive PCR samples were directly sequenced. The sequencing was performed by an Applied Biosystem 3730xI DNA Analyzer on both strands by BMR Genomics srl (Padua, Italy) by using the dideoxychain-termination method (Sanger et al., 1977). Consensus sequence was compared to the sequences deposited in GenBank® using the basic local alignment search tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A nucleotide-nucleotide BLAST search (blastn) was performed using the default settings. The DNA sequences obtained was 99% identical to the *Cytauxzoon* sp. sequences present in GenBank®. The highest identity was obtained with *Cytauxzoon* sp. 18S rDNA partial sequences reported in Italian (Carli et al., 2012), Spanish (Criado-Fornelio et al., 2004; Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007), French (Criado-Fornelio et al., 2009) and Mongolian (Ketz-Reley et al., 2003; Reichard et al., 2005) wild and domestic felids. In contrast, the sequences revealed an identity of 93% with *C. felis* deposited in GenBank®. The new *Cytauxzoon* sp. nucleotide sequence was deposited in the GenBank® database with accession number KF031139. PCR analysis from blood sample for detection of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Willi et al., 2005; Willi et al., 2006), *Bartonella henselae* (Anderson et al., 1994) and *Leishmania infantum* (Solano-Gallego et al., 2007) and to serological detection of FIV antibody and FeLV p27 antigen performed by commercial ELISA tests (ViraCHEK®/FIV and ViraCHEK®/FeLV, Synbiotics Corporation®) resulted negative.

A doxycycline therapy (Vibravet, Pfizer, 10 mg/kg/q12h PO for three weeks) was instituted when piroplasms were found on blood smear evaluation. Then imidocarb dipropionate (Carbesia, Intervet, 5 mg/kg IM for two times two weeks apart) was administered after *Cytauxzoon* sp. infection confirmation by PCR and sequencing (day 14). The cat improved and was monitored for 175 days by serial CBC, biochemical profile and serum protein electrophoresis (table 1). Two weeks after the last imidocarb dipropionate administration (day 43), *Cytauxzoon* sp. was not detected by CBC and PCR analysis. At the 57th day, the cat was weak, anorectic and seriously leukopenic (table 1). Parvovirus infection was revealed by PCR analysis (Decaro et al., 2006). *Cytauxzoon* sp. blood smear evaluation and PCR analysis resulted negative. Metronidazole (Deflamon, SPA, 10 mg/Kg/BID, EV), ranitidine (Ranidil, Menarini 2mg/kg/BID, EV) and fluids were administered. Clinical and laboratory conditions improved. *Cytauxzoon* sp. piroplasms were not detected by blood smear evaluation and PCR analysis during the follow up period.

Cat no. 2 belonged to the same litter of cat no. 1. He was a seven months old, male, domestic shorthair evaluated for diarrhoea on November 2009. Fecal microscopic examination was not performed. CBC, blood smear evaluation, PCR analysis and sequencing were done by San Marco laboratory and *Cytauxzoon* sp. infection was diagnosed. The sequence obtained was deposited in GenBank database with accession number KF031140. Low parasitemia (Carli et al., 2012), leucocytosis with mature neutrophilia, monocytosis and thrombocytosis were present. The instituted therapy with doxycycline (10 mg/kg/q12h PO) was discontinued by the owner after one week. Then the cat was treated with imidocarb dipropionate (5 mg/kg IM for two times two weeks apart). At 130th day, a mild increase of erythrocytes number, normal leukocytic concentration and mild thrombocytosis were observed. Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen and creatinine resulted within normal limits. Other laboratory parameters were not available. The cat was clinically well.

## Discussion

In the present work, we described two cats with natural *Cytauxzoon* sp. infection demonstrated by blood smear evaluation and PCR analysis. Sequence comparison of positive samples, revealed high homology with isolates from Mongolia (Ketz-Reley et al., 2003; Reichard et al., 2005), Spain (Criado-Fornelio

et al., 2004; (Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007), France (Criado-Fornelio et al., 2009) and Italy (Carli et al., 2012). In the present manuscript for the first time infection by *Cytauxzoon* sp. was described in cats from central Italy. In fact, *Cytauxzoon* sp. infection was previously reported in domestic cats only in a focus in Trieste (north eastern Italy) (Carli et al., 2012).

The cats presented with diarrhoea and low parasitemia. Cat no. 1 had a mild non regenerative anemia and cat no. 2 was not anemic. Differentials for the mild non-regenerative anemia include young age (Meyers-Wallen et al., 1984) and inflammatory diseases associated anemia (Stockham and Scott, 2002; Korman et al., 2013). These data were in agreement with previous report where the majority of the *Cytauxzoon* sp. infected cats were apparently healthy and not anemic showing more often subclinical infection and rarely, signs of illness (Carli et al., 2012). In fact both cat no. 1 and cat no. 2 demonstrated a low parasitemia with diarrhoea as the only clinical sign. In cat no. 1 diarrhoea could be consequent to the *Toxocara* sp. infestation as observed by fecal microscopic examination. Though a fecal examination was not performed, this infestation could be the probable cause of diarrhoea also in cat no. 2 as it belonged to the same litter of cat no.1. In addition, in the follow up period, cat no. 2 remained persistently erythroparasitemic with no evidence of illness. In agreement with this data, persistent parasitemia has been previously reported only in three *Cytauxzoon* sp. infected sick cats that were monitored respectively for 25, 288 and 49 days after diagnosis remaining positive to blood smear and PCR analysis (Carli et al., 2012). On the contrary, *C. felis* infection is characterized by nonspecific clinical signs of fever, lethargy, anorexia, dehydration, icterus, pallor of mucous membrane, dyspnea and progressive anemia (Holman et al., 2009). In contrast, wild felids more often are persistently erythroparasitemic and healthy (Meinkoth and Kocan, 2005). Rarely, wild felids had an acute and fatal disease (Garner et al., 1996; Nietfeld and Pollock, 2002). Consequently, infection by *Cytauxzoon* sp. in European domestic cats seems to be more similar to *C. felis* infection in wild felids than in domestic cats. Apparently healthy and persistently parasitemic cats may serve as reservoir for *Cytauxzoon* sp. infection. Accordingly, descriptions of subclinical, persistently and naturally *C. felis* infected domestic cats sometimes were reported in the United States (Meinkoth et al., 2000; Haber et al., 2007; Brown et al., 2008). It could be hypothesized that these cats could serve as additional hosts for this parasite (Brown et al., 2008). The role of *Cytauxzoon* sp. infected domestic cats in the life cycle of the parasite remains unclear and have to be investigated further.

Cat no. 1 appeared to clear up the infection after a doxycycline and imidocarb dipropionate therapy resulting negative to blood smear evaluation and PCR analysis for *Cytauxzoon* sp. detection during follow-up. In contrast, cat no. 2 remained erythroparasitemic but he was treated only with imidocarb dipropionate because doxycycline was discontinued by owner. Moreover, two sick infected cats previously described in the northeastern Italy were treated with antiprotozoan drugs without improvement (Carli et al., 2012). However, sick infected cats were not treated with the combination of doxycycline and imidocarb dipropionate. Various treatments for cytauxzoonosis by *C. felis* have been described (Cohn et al., 2011; Motzel and Wagner, 1990) but to date, no antiprotozoal therapy has been demonstrated to modify the course of the disease in acutely infected cats (Cohn et al., 2011). In naturally infected cats, diminazene aceturate administration led to survival in acute infection (Greene et al., 1999) and was unable to eliminate or decrease the parasite in healthy chronic infection (Lewis et al., 2012). Imidocarb dipropionate and enrofloxacin were unsuccessfully used in asymptomatic domestic cats persistently infected (Brown et al., 2008). Interestingly, the association of imidocarb dipropionate and doxycycline seems to eliminate *Cytauxzoon* sp. erythroparasitemia in cat no. 1. It could not be excluded spontaneous elimination of the parasite or a very low parasitemia undetectable by PCR analysis after therapy. In fact, very low levels of parasite DNA may result in inconsistent PCR results (Brown et al., 2008). Further studies need to assess if treatment is needed in this infection and type of adequate treatment protocol for parasite cure.

The two cats reported in the present study were six and seven-months old at the time of diagnosis and belonging to same litter. The way of transmission of *Cytauxzoon* sp. is unknown. Tick bite is the most likely way of transmission as occurs in *C. felis* infection in cats (Blouin et al., 1984; Reichard et al., 2010). However, vertical transmission of this infection might be considered based on the young age of both cats of the same litter. Interestingly, *Cytauxzoon* sp. infection was previously reported mainly in young-adult cats (Carli et al., 2012). Moreover, a fatal cytauxzoonosis by *C. felis* was described in a free-ranging bobcat cub of approximately 2-3 months old (Nietfeld and Pollock, 2002) and one seven old *C. felis* infected kitten was identified in a study involving Florida Panthers and Texas Cougars (Rotstein et al., 1999). In contrast, lack of evidence for perinatal transmission of *C. felis* in domestic cats was reported (Lewis et al.,



2012). Further studies need to investigate possible ways of transmission for this new emergent infection in cats.

In conclusion, infection by *Cytauxzoon* sp. is present in Italy in the north eastern part of the peninsula but also in the central in domestic cats. One of the two young cats described appeared to clear up the infection after therapy while the other presented persistent erythroparasitemia suggesting a role as a reservoir in domestic cats as an alternative host to wild felids in the life cycle of this parasite.

### Acknowledgments

The authors are grateful to the San Marco laboratory staff especially to Dr. Martina Nicetto for molecular technical support.

### References

- Anderson, B., Sims, K., Regnery, R., Robinson, L., Schmidt, M.J., Goral, S., Hager, C., Edwards, K., 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 942-948.
- Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568-571.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Glenn, B.L., Kocan, K.M., Hair, J.A., 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildl. Dis.* 20, 241-242.
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O., Peterson, D.S., 2008. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 485-488.
- Carli E., Trotta M., Chinelli R., Drigo M., Sinigoi L., Tosolini P., Furlanello T., Millotti A., Caldin M., Solano-Gallego L. 2012. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Vet. Parasitol.* 183, 343-352.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 298-303.

- Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., Brunker, J.D., Ratcliff, E.R., Craig, A.W. 2011. Efficacy of Atovaquone and Azithromycin or Imidocarb dipropionate in cats with acute cytauxzoonosis. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 55-60.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73-76.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119, 337-345.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C. 2006. Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods*, 133, 92-99.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134, 77-85.
- Garner, M.M., Lung, N.P., Citino, S., Greiner, E.C., Harvey, J.W., Homer, B.L., 1996. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Vet. Pathol.* 33, 82-86.
- Greene, C.E., Latimer, K., Hopper, E., Shoemaker G., Lower, K., Cullens, F. 1999. Administration of diminazene aceturate or imidocarb dipropionate for treatment of cytauxzoonosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 497-500.
- Haber, M.D., Tucker, M.D., Marr, H.S., Levy, J.K., Burgess, J., Lappin, M.R., Birkenheuer, A.J. 2007. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. *Vet. Parasitol.* 146, 316-320.
- Holman, P.J., Snowden, K.F., 2009. Canine hepatozoonosis and babesiosis, and feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 39, 1035-1053.
- Jackson, C.B., Fisher, T., 2006. Fatal cytauxzoonosis in a Kentucky cat (*Felis domesticus*). *Vet. Parasitol.* 139, 192-195.
- Ketz-Riley, C.J., Reichard, M.V., Van den Bussche, R.A., Hoover, J.P., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2003. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.* 39, 424-430.
- Korman, R.M., Hetzel, N., Knowles, T.J., Harvey, A.M., Tasker, S. 2013 A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. *J. Fel. Med. Surg.* 15, 81-90.

- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J. 2012. Lack of evidence for perinatal transmission of *Cytauxzoon felis* in domestic cats. *Vet. Parasitol.* 188, 172-174.
- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J. 2012. Diminazene diaceturate for treatment of chronic *Cytauxzoon felis* parasitemia in naturally infected cats. *J. Vet. Int. Med.* 26, 1490-1493.
- Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J. Wildl. Dis.* 41, 810-815.
- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., 2005. Feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 35 (1), 89-101.
- Meinkoth, J., Kocan, A.A., Whitworth, L., Murphy, G., Fox, J.C., Woods, J.P. 2000. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998). *J. Vet. Int. Med.* 14, 521-525.
- Meyers-Wallen, V.N., Hanskins, M.E., Petterson, D.F., 1984. Hematologic values in healthy neonatal, weanling and juvenile kittens. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1322-1327.
- Millan, J., Naranjo, V., Rodriguez, A., de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134 (Pt 7), 995-1001.
- Motzel, S.L., Wagner, J.E., 1990. Treatment of experimentally induced cytauxzoonosis in cats with Parvaquone and Buparvaquone. *Vet. Parasitol.* 35, 131-138.
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 38, 607-610.
- Reichard, M.V., Edwards, A.C., Meinkoth, J.H., Snider, T.A., Meinkoth, K.R., Heinz, R.E., Little, S.E., 2010. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. *J. Med. Entomol.* 47, 890-896.
- Reichard, M.V., Meinkoth, J.H., Edwards, A.C., Snider, T.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Little, S.E. 2009. Transmission of *Cytauxzoon felis* to domestic cat by *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol.* 161 (1-2), 110-115.
- Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91, 420-426.
- Rotstein, D.S., Taylor, S.K., Harvey, J.W., Bean, J., 1999. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *J. Wildl. Dis.* 35, 613-617.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science U. S. A. 74 (12), 5463-5467.
- Shock, B.C., Murphy, S.M., Patton, L.L., Shock P.M., Olfenbittel, C., Beringer, J., Prange, S., Grove, D.M., Peek, M., Butfiloski, J.W., Hughes, D.W., Mitchell Lockhart, J., Bevins, S. N., VandeWoude, S., Crooks, K.R., Nettles, V.F., Brown, H. M., Peterson, D. S., Yabsley, M. J. 2011. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir and other wild felids in thirteen states. Vet. Parasitol. 175, 325-330.
- Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. Vet. Parasitol. 147, 315-319.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. Vet. Parasitol. 157, 211-221.
- Stockham, S.T., Scott, M.A. 2002. Erythrocytes. In: Stockham, S.T., Scott, M.A. (Eds.), Fundamentals of veterinary clinical pathology 1th ed. Blackwell publishing, Ames, Iowa pp.85-154.
- Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 44, 961-969.
- Willi, B., Boretti, F.S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M.L., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 43, 2581-2585.

Table 1. Serial laboratory findings for cat no. 1 during the follow up period

	DAY 1	DAY 43	DAY 57	DAY 63	DAY 87	DAY 175
<b>LABORATORY PARAMETERS</b>						
<u>(reference interval)</u>						
RBC (6.35-9.50 x 10 <sup>6</sup> /μL)	5.9	9.01	8.67	7.21	8.28	8.93
Hemoglobin (9.6-14.3 g/dL)	8.6	12.8	11.9	9.8	12	12.4
Hct (28-42.5 %)	30.1	39.7	35.9	32.3	42.1	43.3
WBC (5-11 x 10 <sup>3</sup> /μL)	11.67	8.91	0.64	2.47	8.02	10.72
Segmented neutrophils (2500-7000/μL)	6864	4591	96	649	4452	4601
Monocytes (65-250/μL)	396	249	15	165	104	246
PLT (130-430 x 10 <sup>3</sup> /μL)	456	458	256	22	441	402
CPK (90-320 IU/L)	130			697		
ALP (19-70 IU/L)	109			23		
Total protein (6.3-7.8 g/dL)	6.5			6.5		
Albumin (3-4 g/dL)	3.1			2.5		
Globulin (3-4.5 g/dL)	3.4			4		
Total bilirubin (0.14-0.26 g/dL)	0.21			0.17		
BUN (32-64 mg/dL)	41			72		47
Creatinine (0.95-1.85 mg/dL)	0.91			1.09		1.35
Glucose (86-116 mg/dL)	99			91		
Iron (50-118 μg/dL)	38			209		
UIBC (130-225 μg/dL)	232			22		
SAA (0.1-0.5 μg/mL)	1.3			77.8		0.1
α-globulin (17.8-27.6%)	16.7			28.2		
β-globulin (6.4-9.4%)	15.2			14.7		
PCR results	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Presence of piroplasms in blood smear	POS (+)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

RBC= Red Blood Cells, Hct= hematocrit, WBC= White Blood Cells, PLT= platelets, CPK= Creatinine Phosphokinase, ALP= alkaline Phosphatase, BUN= Blood Urea Nitrogen, UIBC= Unsaturated Iron Binding Capacity, SAA= Serum Amyloid A protein, PCR= Polymerase Chain Reaction.



Figure1 Geographical location of Acquapendente (42°44'41"N, 11°51'54"E, Viterbo) (blue spot), the little town located in the north part of the Lazio, on the border with Umbria and Tuscany (central Italy) where cats no. 1 and 2 were born and lived until the adoption (<http://i.wikipedia.org/wiki/Acquapendente>). Geographical location of Trieste (red spot), the town where an endemic focus of *Cytauxzoon* sp. infection was described.

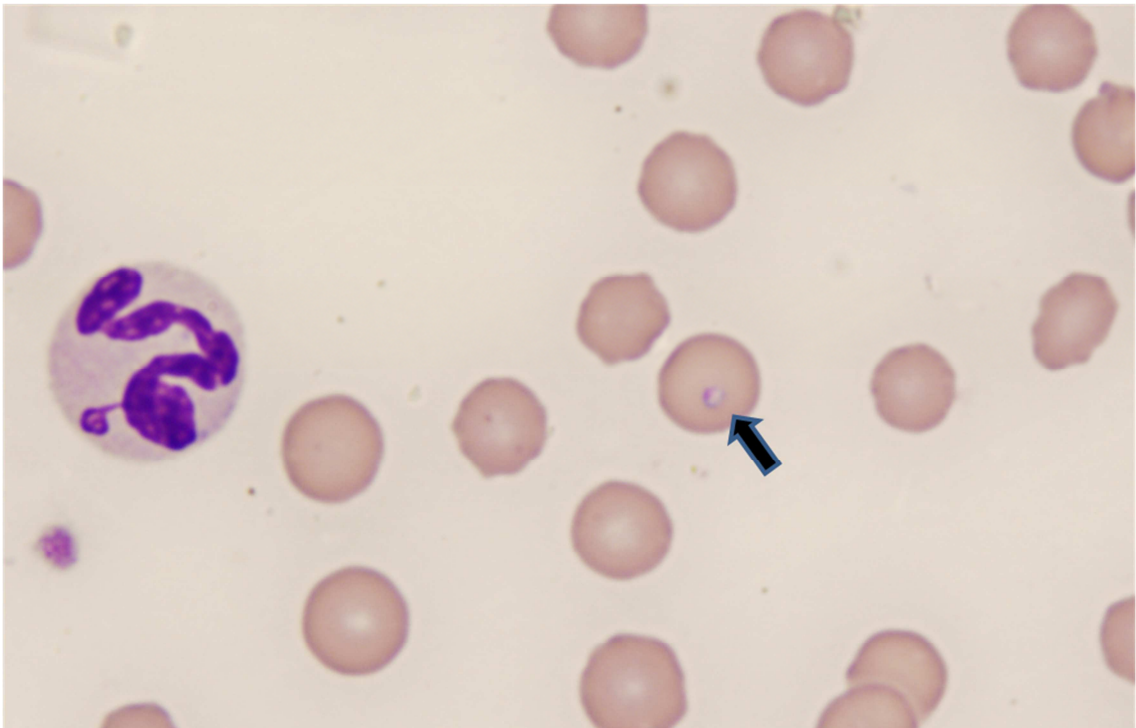


Figure 2 *Cytauxzoon* sp. parasite inside red blood cell (arrow) in cat no. 1. in blood smear stained by the modified Wright technique (Aerospray slide stainer 7120 Delcon®, 1000x). *Cytauxzoon* sp. appears as individual, small round to oval signet ring intraerythrocytic organisms of 0.5-0.8  $\mu$ m of diameter with an eccentric basophilic nucleus and a lightly basophilic cytoplasm.

## *Capitolo Terzo*

*First study of *Cytauxzoon* sp. transmission:  
evaluation of ectoparasites, uterus and  
fetus removed from infected domestic cats.  
Could a vertical transmission be  
considered?*

Carli E, Trotta M, Masserdotti C, Chinelli R, Montarsi F, Nicetto M, Furlanello T, Pietrobelli M, Capelli G, Solano-Gallego L., 2013. Spedito a Veterinary Parasitology.

**Riassunto.** La cytauxzoonosi è una malattia trasmessa da zecche causata da *Cytauxzoon felis* (*C. felis*) e ben documentata nei gatti domestici soprattutto negli Stati Uniti. *Cytauxzoon* sp., simile dal punto di vista molecolare a *C. felis*, è stato sporadicamente descritto in Europa ma le informazioni riguardo questo patogeno sono limitate. Le vie di trasmissione dell'infezione da *Cytauxzoon* sp. non sono note. Lo scopo di questo lavoro è di valutare, mediante esame istopatologico e/o analisi molecolare, la presenza di *Cytauxzoon* sp. nelle zecche e nelle pulci raccolte dai gatti domestici e nell'utero, nella placenta e nei feti ottenuti da soggetti infetti che vivono in un'area endemica per questo patogeno (Trieste, Italia). Cinque gatti su 15 sono risultati positivi alla ricerca di *Cytauxzoon* sp. su sangue. La PCR eseguita sulle zecche *Rhipicephalus sanguineus* (n=1) e *Ixodes ricinus* (n=9) e sulle pulci *Ctenocephalides felis felis* (n =28) raccolte dai gatti non ha permesso di trovare il parassita. Due soggetti infetti hanno avuto esito positivo alla PCR eseguita sull'utero. In una gatta gravida, sono stati osservati inclusi compatibili con schizonti di *Cytauxzoon* sp. all'interno dei macrofagi nella placenta e nel muscolo di un feto. Queste osservazioni fanno ipotizzare che la via verticale possa rappresentare una modalità di trasmissione di questa infezione nel gatto domestico.



**Abstract.** Cytauxzoonosis is a tick transmitted protozoan disease caused by *Cytauxzoon felis* (*C. felis*) well documented in domestic cats especially in the United States. *Cytauxzoon* sp., molecularly similar to *C. felis*, has been sporadically reported in domestic cats in Europe but limited information is available. *Cytauxzoon* sp. ways of transmission are unknown. The aim of this study was to investigate the presence of *Cytauxzoon* sp. in fleas and ticks removed from domestic cats and in uterus, placenta and fetus obtained from infected cats living in an endemic area (Trieste, Italy) by means of histopathological evaluation and/or PCR analysis. Five out of 15 cats were positive by *Cytauxzoon* sp. PCR on blood. The parasite was not detected by molecular analysis on *Rhipicephalus sanguineus* (n=1) and *Ixodes ricinus* (n=9) ticks and on *Ctenocephalides felis felis* (n =28) fleas collected from the cats. Two infected cats resulted positive to uterus PCR analysis. In a pregnant cat, inclusions compatible with *Cytauxzoon* sp. schizonts were observed on macrophages in placenta and muscular samples of fetus. These findings suggest that vertical transmission is a possible way of transmission of this infection in domestic cats.

**Key words:** *Cytauxzoon* sp. vertical transmission, domestic cats, ticks, fleas

## Introduction

*Cytauxzoon felis* (*C. felis*) is protozoan hemoparasite causing a tick transmitted infection of wild and domestic felids called cytauxzoonosis and described prevalently in the United States (Birkenheuer et al., 2006).

*Cytauxzoon felis* belongs to family Theileridae (subphylum Apicomplexa, class Piropasmida) (Ketz-Reily et al., 2003). Genera *Cytauxzoon*, *Babesia* and *Theileria* are closely related (Meinkoth and Kocan, 2005, Schnittger et al., 2012). *Babesia* has only an intraerythrocytic phase while *Theileria* and *Cytauxzoon* have a tissue phase, localized in the lymphocytes and mononuclear phagocytes, respectively (Meinkoth and Kocan, 2005; Kier et al., 1987). Life cycle of *C. felis* consists of two distinct forms termed piroplasm (erythrocytes) and schizont (tissue) (Meinkoth and Kocan, 2005). Sporozoites are transmitted by infected ticks and are localized in the host in the endothelial-associated mononuclear phagocytes reproducing and developing a single large schizont within each cell (Holman and Snowden, 2009). Parasitized cells protrude in the lumen of the veins in different organs, undergo to rupture and release merozoites into circulation. Free merozoites enter erythrocytes giving rise to parasitemia (Brown et al., 2008). Schizogenous phase is generally associated with a rapidly, progressive, systemic and often fatal disease in the domestic cats (Meinkoth et al. 2000). Schizont-laden macrophages were observed within the lumens of veins of lungs, liver, lymph nodes, spleen (Wagner, 1976) and bone marrow (Blouin et al., 1984).

The North American bobcat (*Lynx rufus*) is considered the natural reservoir for *C. felis* (Holman and Snowden, 2009). Tick of species *Dermacentor variabilis* (*D. variabilis*) experimentally transmitted infection from bobcats to domestic cats (Blouin et al., 1984) and tick of species *Amblyomma americanum* (*A. americanum*) was confirmed as competent vector in the transmission to domestic cat (Reichard et al., 2009, 2010).

Transplacental transmission of hemoprotozoan as *Theileria equi* in the horse (Allsopp et al., 2007) or *Babesia gibsoni* (Fukumoto et al., 2005) in the dog was reported while there is no evidence of perinatal transmission of *C. felis* in domestic cats (Weisman et al., 2007; Lewis et al., 2012).

In the last years, *Cytauxzoon* sp., a protozoan molecularly similar to *C. felis*, was described from Mongolian (Ketz-Riley et al., 2003), Spanish (Criado-Fornelio et al., 2004, Luaces et al., 2005), French (Criado-Fornelio et al., 2009) and Italian (Carli et al., 2012) domestic and wild cats. In particular, *Cytauxzoon*

sp. was reported as single case in Spain (Criado-Fornelio, 2004) and France (Criado-Fornelio, 2009) in the domestic cats while an endemic focus was described with a prevalence of 23% in domestic cats owned and living in colonies in Trieste, north eastern of Italy (Carli et al., 2012). There is lack of information about life cycle and transmission of this parasite. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of *Cytauxzoon* sp. in fleas and ticks removed from domestic cats from Trieste's colonies and in uterus, and fetus obtained from infected cats by means of histopathological evaluation and/or molecular analysis.

## **Materials and methods**

### **Cats**

The study was conducted in Trieste, northeastern of Italy (45°30'N, 13°48'E), from June 2009 to February 2011. Fifteen apparently healthy free-roaming cats captured and anesthetized for spaying or neutering were enrolled. The cats were caught and released for birth control according to Italian laws. The cats lived in colonies located in the urban area of the city. Inclusion criteria were infestation by ticks and/or fleas and/or pregnancy as assessed during the ovariohysterectomy.

### **Samples**

K<sub>3</sub>EDTA blood samples and blood smears were obtained from all the cats. Cell blood count (CBC) was assessed as previously described (Furlanello et al., 2005; Carli et al., 2012) within 24h after the collection. CBC was performed by automatic cell counter (ADVIA® 2120, Bayer) in conjunction with the evaluation of blood smears stained by the modified Wright technique (Aerospray slide stainer 7120 Delcon®). If the K<sub>3</sub>EDTA blood volume was low, sample was only used for PCR analysis and only blood smear was evaluated.

Nine ticks and 27 fleas collected from the cats were stored in a 70% ethanol solution and frozen at -20°C until morphological identification and PCR analysis were performed. Uterus (n=9) and fetus (n=2) were taken from nine pregnant cats, were placed in 10% buffered formalin and stored. In addition, portions of uterus from 7/9 pregnant cats were gathered in saline solution. All laboratory analyses were performed at the San Marco Laboratory, Padua, Italy.

## **Ticks and fleas identification**

Ticks and fleas stored in ethanol were dried at room temperature and then morphologically identified using a stereo microscope and following identification keys (Walker, 1994; Manilla 1998). Ticks and fleas identification was performed at the Parasitology Laboratory of the *Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie*, Padua, Italy.

## **DNA extraction and PCR analysis on blood**

DNA extraction was performed from EDTA blood of all the cats by the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol with some modifications (Carli et al., 2012). A fragment of 18S rRNA gene of *Piroplasmidae* species was amplified by conventional PCR as previously described (Carli et al., 2012; Solano-Gallego et al., 2008; Carret et al., 1999). Positive PCR samples were used for direct sequencing (Sanger et al., 1977). Consensus sequence was compared to the sequences deposited in GenBank® using the basin local alignment search tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A nucleotide-nucleotide BLAST search (blastn) was performed using the default settings.

## **Histopathology**

After fixation, transversal serial sections of three uterus, two placenta and two fetus of *Cytauxzoon* sp. infected cats diagnosed by blood PCR were obtained. Samples were routinely processed, paraffin embedded, sectioned at 4µm and stained with the hematoxylin and eosin method.

## **PCR analysis of ticks and fleas**

The DNA was isolated from individual ticks by using the High Pure PCR template preparation kit with some modifications (Roche, Mannheim, Germany). Fleas and ticks were resuspended in an Eppendorf tube, containing 200 µL of binding buffer, 200 µL of tissue lysis buffer and 40 µL of proteinase K (100 µg/mL). Later, they were mechanically crushed with a sterile micropestle and incubated overnight (65 °C). The final elution volume was 50 µL for each specimen (Trotta et al., 2012). Pools of 2-6 fleas of the same gender were analysed when a cat had more than one flea. The obtained DNA was used for

PCR amplification of *Piroplasmidae* species as previously described (Carli et al., 2012).

### PCR analysis from fresh tissues

The DNA extraction was performed on utero samples stored in saline solution by using the High Pure PCR template preparation kit with some modifications (Roche, Mannheim, Germany). A piece of utero of 150 mg was resuspended in an Eppendorf tube containing 200 µL of tissue lysis buffer, 200 µL of binding buffer and 40 µL of proteinase K (100 µg/mL). Later, it was mechanically crushed with a sterile micropestle and incubated one hour at 72°C. The final elution volume was 50 µL for each sample.

## Results

Domestic shorthair cats, male (n=2) and female (n=13) with estimate age ranging from 12 to 54 months were enrolled in the study. Twenty-seven fleas (18 females and nine males) were taken from four cats and identified as *Ctenocephalides felis felis* (*C. felis felis*). Nine ticks including eight female *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) and one female *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) were collected from 6 cats. Cats did not present at the same time ticks and fleas.

CBCs and blood smear evaluations were performed in 12/15 cats. In three cases only blood smear evaluation was available. Single intraerythrocytic inclusions referred to piroplasms with a light basophilic cytoplasm and intensively basophilic nucleus were observed at the microscopic blood smear evaluation in three cats. *Cytauxzoon* sp. infection was diagnosed in 5/15 (33%) cats by PCR analysis. An identity of 99% between the *Cytauxzoon* sp. sequences present in GenBank® and the sequences achieved in the present work was revealed. The highest identity was obtained with *Cytauxzoon* sp. 18S rDNA partial sequences reported in Italian (Carli et al., 2012), Spanish (Criado-Fornelio et al., 2004; Luaces et al., 2005; Millan et al., 2007), French (Criado-Fornelio et al., 2009) and Mongolian (Ketz-Riley et al., 2003; Reichard et al., 2005) wild and domestic felids. In contrast, the sequences revealed an identity of 93% with *C. felis* deposited in GenBank®. The new *Cytauxzoon* sp. nucleotide sequences obtained from blood and uterus of cat no. 2 and 7 were deposited in the GenBank®.database with following accession number: KF797918 (blood of cat no. 2), KF 797919 (uterus of cat no. 2), KF797920 (blood of cat no. 7) and KF797921 (uterus of cat no.7).

CBC was available in 4/5 infected cats with the following results: mild anemia (2/4), leukocytosis (2/4), leukopenia (1/4), neutrophilia (1/4), neutropenia (1/4), monocytosis (1/4), eosinophilia (2/4) and thrombocytosis (2/4). Histopathological evaluation and PCR analysis results are reported in table 1. PCR analysis performed from uterus stored in saline solution resulted positive in cat no 2 and 7. Histological microscopic evaluation was assessed in utero (n=3), placenta (n=2) and fetus (n=2) in cats no. 1, 2 and 7 diagnosed with *Cytauxzoon* sp. infection by blood PCR. Both fetus belonged to cat no 7.

Only one tick resulted positive to PCR analysis and the following sequencing revealed presence of *Babesia* sp. EU1. *Cytauxzoon* sp. DNA was not detected from ticks and fleas.

On light microscopic examination of tissues obtained from cat no. 7, a very low number of inflammatory cells, mostly represented by mononuclear cells were observed in the muscular perimysium of the chest wall in one of the two fetus (Fig. 1). The cytoplasm of some cells, consistent with macrophages, contained a variable number of small eosinophilic, 1 to 2  $\mu\text{m}$  in diameter, round to vesicular bodies. The cytoplasmic structures were morphologically comparable to those described as schizonts containing developing stage of *C. felis* (Kier et al., 1987; Susta et al., 2009; Aschenbroich et al., 2012). Inflammatory cells with the same features were observed in the vascular lumina of the placenta (Fig. 2 and Fig. 3). No abnormalities in the others tissues were observed. Microscopic evaluation of samples obtained from the other infected cats did not reveal presence of structures compatible with *Cytauxzoon* sp. schizonts.

## Discussion

In the present study, tissues inclusions compatible with schizonts of *Cytauxzoon* sp. were described, for the first time, in an infected pregnant cat. Particularly, *Cytauxzoon* sp. schizonts were observed in the vascular lumina of the placenta and in the muscular perimysium of one fetus. In addition PCR analysis performed on uterus resulted positive for *Cytauxzoon* sp. In previous descriptions of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic and wild felids in Spain (Criado-Fornelio et al., 2004, Luaces et al., 2005), France (Criado-Fornelio et al., 2009) and Italy (Carli et al., 2012), only intraerythrocytic piroplasmid forms were observed. Moreover, in a preceding *Cytauxzoon* sp. infected feline case, histopathological and molecular evidence of this parasite was not found on

various tissues samples evaluated after cat euthanasia, while piroplasms were present on red blood cells (Carli et al., 2012). In *C. felis* infection, tissue phase is well documented especially in domestic cats (Kier et al., 1987; Butt et al., 1990) even if it was sporadically reported also in wild felids (Jacob and Wesemeier, 1996; Nietfeld and Pollock, 2002). Histological schizont detection was reported in endothelial-associated mononuclear phagocytes in the brain, heart, lung, intestine, liver, spleen, bone marrow, lymph node and kidney (Wagner, 1976; Ferris, 1979; Butt et al., 1991; Jackson and Fisher, 2006) of infected subjects. On the other hand, no schizonts were observed on fetal tissues (skeletal muscle, developing bone with marrow and placenta) in a pregnant *C. felis* infected cat died shortly after partial abortion that presented numerous schizont-laden macrophages in other histologic sections (Weisman et al., 2007).

The presence of structures compatible with schizonts in the fetal tissue of the cat reported in the present work suggests that a congenital transmission could be considered as a possible way of transmission of *Cytauxzoon* sp. infection. Perinatal transmission of other hemoprotozoa closely related to *Cytauxzoon* is reported. In fact, evidence of transplacental transmission of *Theileria equi* from mares to foals (Allsopp et al., 2007; Georges et al., 2011), or feline *Babesia* from a queen to kittens (Jacobson et al., 2007), or canine *Babesia gibsoni* (Fukumoto et al., 2005) and canine *Babesia microti*-like from a bitch to her pups (Simões et al., 2011) and *Babesia microti* from a woman to her infant (Sethi et al., 2009; Joseph et al., 2012) were described. In contrast, until now, evidence for perinatal transmission of *C. felis* in domestic cats is lacking (Weisman et al., 2007; Lewis et al., 2012) even if infection in a seven days old kitten was observed during a study of hematological effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars (Rotstein et al., 1999). In addition a fatal cytauxzoonosis was described in a free-ranging bobcat cub of approximately 2-3 months old (Nietfeld and Pollock, 2002) and in a 6-months-old captive-reared lion cub in Brazil (Peixoto et al., 2007). Moreover *C. felis* infection was reported in kitten of 2 months of age (Birkenheuer et al., 2006). In agreement with this data, the focus previously described in Italy *Cytauxzoon* sp. infection involved prevalently young-adult cats (Carli et al., 2012). The present findings need further confirmation employing immunohistochemical method or hybridation in situ of intracytoplasmatic vesicular bodies and more investigations are necessary to prove vertical transmission in *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats.

Ticks of species *I. ricinus* and *R. sanguineus* and fleas of species *C. felis felis* were collected from cats involved in this work. PCR analysis did not reveal presence of *Cytauxzoon* sp. DNA in any arthropod removed from infected cats. No information about the role of the ectoparasites in the *Cytauxzoon* sp. infection is available on literature. On the contrary, in *C. felis* life cycle, it is considered that ticks become infected through ingestion of parasitized erythrocytes during a blood meal from infected cats (Blouin et al., 1984; Reichard et al., 2010). Experimentally, ticks of species of *A. americanum* and *D. variabilis* transmitted *C. felis* from cat to cat and from lynx to cat respectively (Blouin et al., 1984; Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010). However, the role of *A. americanum* as a vector of *C. felis* infection is confirmed (Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010) while the role of *D. variabilis* remains unclear because not always it has forwarded the parasite (Blouin et al., 1984; Reichard et al., 2009; Reichard et al., 2010).

As a low number of ectoparasites were collected and analyzed in the present study, more ticks and fleas have to be evaluated to understand if *I. ricinus*, *R. sanguineus* or other ectoparasites could play a role in the life cycle of *Cytauxzoon* sp. or have to be excluded as possible vectors. Another possibility is that other species of ticks or fleas present in Italian country could act as vectors of these protozoa. In particular, the most common species in the central and northern regions of Italy as *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes hexagonus*, *I. canisuga*, *Dermacentus marginatus* and *Haemaphysalis punctata* could be involved (Estrada-Pena et al., 2004; Cringoli et al., 2005; Cassini et al., 2009, Iori et al., 2010; Montarsi et al., 2011). More arthropods should be captured and analyzed to determine the presence of *Cytauxzoon* sp. infected ticks and to see if they are involved in the parasite transmission. Interestingly one *I. ricinus* tick taken from cat no. 1 resulted positive for *Babesia* EU1, a pathogen affecting particularly roe deer (Tampieri et al., 2008), responsible of babesiosis in the human being (Herwaldt et al., 2003) and reported in *I. ricinus* ticks in northeastern of Italy (Capelli et al. 2012; Cassini et al., 2010).

In addition to tick-borne and vertical transmission, horizontal transmission occurring by saliva and blood during fighting between felids could be a possible way of transmission of this infection as occurs for instance in dogs with *B. gibsoni* (Birkenheuer et al., 2005, Jefferies et al., 2007). Moreover, direct transmission by blood transfusion has to be taken in account (Ayoob et al., 2010), in fact cytauxzoonosis is one of the diseases that have to be included in the feline blood donor screening (Reine, 2004). In particular based on the



outdoor life style of the colony cats included in the present work, transmission by bite and fighting, might be feasible. Further studies are needed to ascertain this way of transmission.

*Cytauxzoon* sp. infected cats reported in this manuscript were apparently healthy. Mild anemia was observed in two cats. According with previous reports, anemia was not a frequent clinicopathological finding during *Cytauxzoon* sp. infection and erythroparasitemia was often observed in cats with absent or few clinical signs (Carli et al., 2012). In fact subclinical infection is considered frequent in *Cytauxzoon* sp. infected domestic cats while case of cytauxzoonosis with clinical signs and fatal outcome are rare (Carli et al., 2012). On the contrary, in *C. felis* infection, anemia is a common abnormality in infected cats and fatal acute disease is often described (Greene et al., 2006) while only sporadically cases of cats surviving infection (Walker and Cowell, 1995) or persistently parasitemic without clinical illness are reported (Brown et al., 2008, 2010).

In conclusion, we reported the first description of supposed schizonts of *Cytauxzoon* sp. in macrophages of an infected pregnant cat. In particular, the supposed presence of schizonts in placenta and fetus and the detection of *Cytauxzoon* sp. DNA in two uterus samples suggest that vertical transmission is a possible way of transmission of this infection in domestic cats.

### Acknowledgements

The authors are grateful to the San Marco laboratory staff especially to Arianna Martini for histopathological technical support.

### References

- Allsopp, M.T., Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet. Parasitol.* 148, 130-136.
- Ayoob, A.L., Hackner, S.G., Prittie, J., 2010. Clinical management of canine babesiosis. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 20, 77-89.
- Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 942-947.
- Birkenheuer, A.J., Le, J.A., Valenzisi, A.M., Tucker, M.D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2006. *Cytauxzoon felis* infection in cats in

- the mid-Atlantic states: 34 cases (1998-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 568-571.
- Butt, M.T., Bowman, D., Barr, M.C., Roelke, M.E., 1991. Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from a Florida panther (*Felis concolor coryi*) to a domestic cat. *J. Wildl. Dis.* 27, 342-347.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Glenn, B.L., Kocan, K.M., Hair, J.A., 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildl. Dis.* 20, 241-242.
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O., Peterson, D.S., 2008. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 485-488.
- Brown, H.M., Lockhart, J.M., Latimer, K.S., Peterson, D.S., 2010. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. *Vet. Parasitol.* 172 (3-4), 311-316.
- Capelli, G., Ravagnan, S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Cazzin, S., Porcellato, E., Babiker, A.M., Cassini, R., Salviato A., Cattoli, G., Otranto, D., 2012. Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit. Vectors* 5, 1-10.
- Cassini, R., Bonoli, C., Montarsi, F., Tessarin, C., Marcer, F., Galuppi, R., 2010. Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in northern Italy. *Vet. Parasitol.* 171, 151-154.
- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165, 30-35.
- Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., Furlanello, T., Millotti, A., Caldin, M., Solano-Gallego, L., 2012. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Vet. Parasitol.* 183, 343-352.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 298-303.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular

- characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73-76.
- Cringoli, G., Iori, A., Rinaldi, L., Veneziano, V., Genchi, G., 2005. *Mappe parassitologiche (6)*. Rolando Editore, Napoli, p. 264.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region. University of Zaragoza, Spain, p. 131.
- Ferris, D.H., 1979. A progress report of the status of a new disease of American cats: cytauxzoonosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1, 269-276.
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., Xuan, X., 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.* 35, 1031-1035.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134, 77-85.
- Greene, C.E., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2006. Cytauxzoonosis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Disease of the Dog and the Cat*. Saunders, St. Louis, pp. 716-722.
- Georges, K.C., Ezeokoli, C. D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R., Yabsley, M.J., 2011. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet. Parasitol.* 175, 363-366.
- Herwaldt, B.L., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, U., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 942-948.
- Holman, P.J., Snowden, K.F., 2009. Canine hepatozoonosis and babesiosis, and feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. Small Anim.* 39, 1035-1053.
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli M., Tampieri, M.P., Galuppi, R., Cancrini G., 2010. Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet. Parasitol.* 170, 291-296.
- Jackson, C.B., Fisher, T., 2006. Fatal cytauxzoonosis in a Kentucky cat (*Felis domesticus*). *Vet. Parasitol.* 139, 192-195.
- Jakob, W., Wesemeier, H.H., 1996. A fatal infection in a Bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *J. Comp. Pathol.* 114, 439-444.
- Jacobson, L., Schoeman, T., Lobetti, R., 2007. A survey of feline babesiosis in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71, 222-228.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Broughton, D.K., Robertson, I.D., Irwin, P.J., 2007. Blood, Bull terriers

- and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust. Vet. J.* 85, 459-463.
- Joseph, J.T., Purtill, K., Wong, S.J., Munoz, J., Teal, A., Madison-Antenucci, S., Horowitz, H.W., Agüero-Rosenfeld, M.E., Moore, J.M., Abramowsky, C., Wormser G.P., 2012. Vertical transmission of *Babesia microti*, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1318-1321.
- Ketz-Riley, C.J., Reichard, M.V., Van den Bussche, R.A., Hoover, J.P., Meinkoth, J., Kocan, A.A., 2003. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.* 39, 424-430.
- Kier, A.B., Wagner, J.E., Kinden, D.A., 1987. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *J. Comp. Path.* 97, 415-432.
- Lewis, K.M., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., 2012. Lack of evidence for perinatal transmission of *Cytauxzoon felis* in domestic cats. *Vet. Parasitol.* 188, 172-174.
- Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J. Wildl. Dis.* 41, 810-815.
- Manilla, G., 1998. Acari. Ixodida In: *Fauna d'Italia Vol. XXXVI*. Calderini, pp. 280 p + viii
- Meinkoth, J.H., Kocan, A.A., 2005. Feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 35, 89-101.
- Millan, J., Naranjo, V., Rodriguez, A., de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134, 995-1001.
- Montarsi, F., Maioli, G., Fois, F., Mereu Piras, P., Magliano, A., Pascucci, I., Toma, L., Mignone, W., Torina, A., Capelli, G., 2011. Uncommon ticks from Italy. In: *Proceedings of VII Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP7)*, Zaragoza, Spain, p. 213.
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 38, 607-610.
- Peixoto, P.V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.* 145, 383-387.
- Reichard, M.V., Edwards, A.C., Meinkoth, J.H., Snider, T.A., Meinkoth, K.R., Heinz, R.E., Little, S.E., 2010. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to domestic cats. *J. Med. Entomol.* 47, 890-896
- Reichard, M.V., Meinkoth, J.H., Edwards, A.C., Snider, T.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Little, S.E., 2009. Transmission of *Cytauxzoon felis* to domestic cat by *Amblyomma*

- americanum*. Vet. Parasitol. 161, 110-115.
- Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids J. Parasitol. 91, 420-426.
- Reine, N.J., 2004. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 19, 68-74.
- Rotstein, D.S., Taylor, S.K., Harvey, J.W., Bean, J., 1999. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. J. Wildl. Dis. 35, 613-617.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. *Babesia*: a world emerging. Infect. Genet. Evol. 12, 1788-1809.
- Sethi, S., Alcid, D., Kesarwala, H., Tolan, R.B. jr, 2009. Probable congenital babesiosis in infant, New Jersey, USA. Emerg. Infect. Dis. 15, 788-791.
- Simões, P.B., Cardoso, L., Araújo, M., Ysaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2011. Babesiosis due to canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. Parasit. Vectors. 4, 1-6.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. Vet. Parasitol. 157, 211-221.
- Susta, L., Torres-Velez, F., Zhang, J., Brown, C., 2009. An in situ hybridization and immunohistochemical study of cytauxzoonosis in domestic cats. Vet. Pathol. 46, 1197-2004.
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M., 2008. Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 667-674.
- Trotta, M., Nicetto, M., Fogliazza, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2012. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy. Ticks Tick Borne Dis. 3, 294-297.
- Wagner, J.E., 1976. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 168, 585-588.
- Walker, D.B., Cowell, R.L., 1995. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 206, 1363-1365.
- Walker, A., 1994. Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification.

Chapman and Hall, London, pp. 147-154.

Weisman, J.L., Woldemeskel, M., Smith, K.D., Merrill, A., Miller, D.,

2007. Blood smear from a pregnant cat that died shortly after partial abortion. *Vet. Clin. Path.* 36, 209-211.

Table 1. Results of blood and uterus PCR analysis and histological evaluation of uterus, placenta and fetus of pregnant cats

<i>Cat no</i>	<i>Blood PCR</i>	<i>Uterus in saline PCR PCR<sup>c</sup></i>	<i>Histology of utero (schizont detection)</i>	<i>Histology of placenta (schizont detection)</i>	<i>Histology of fetus (schizont detection)</i>
1	Positive	Negative	Negative	Negative	
2	Positive	Positive	Negative	Negative	
3	Negative	Negative			
4	Negative	Negative			
5	Negative	Negative			
6	Negative	Negative			
7	Positive	Positive	Negative	Positive	Positive

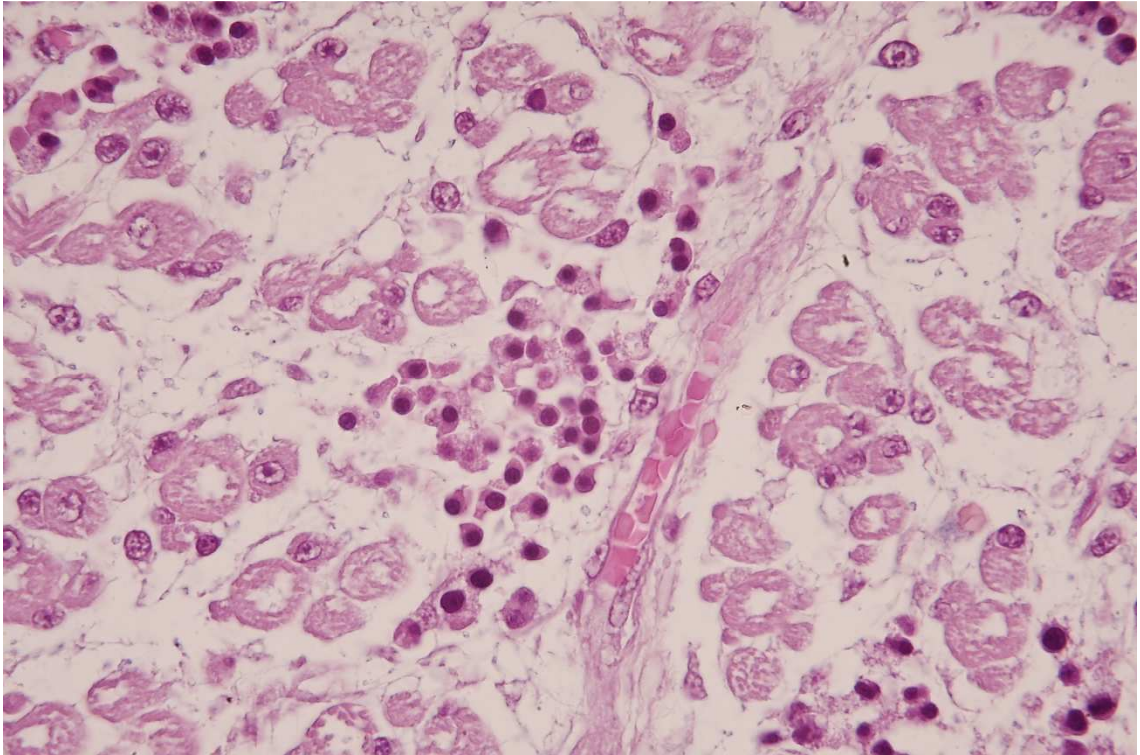


Figure 1. In the perimysium of the muscular chest wall of fetus from cat no. 7, some round mononuclear cells, consistent with macrophages with intracytoplasmic roundish vesicular bodies suggestive of *Cytauxzoon* sp. schizonts were noted (HE, 40X)

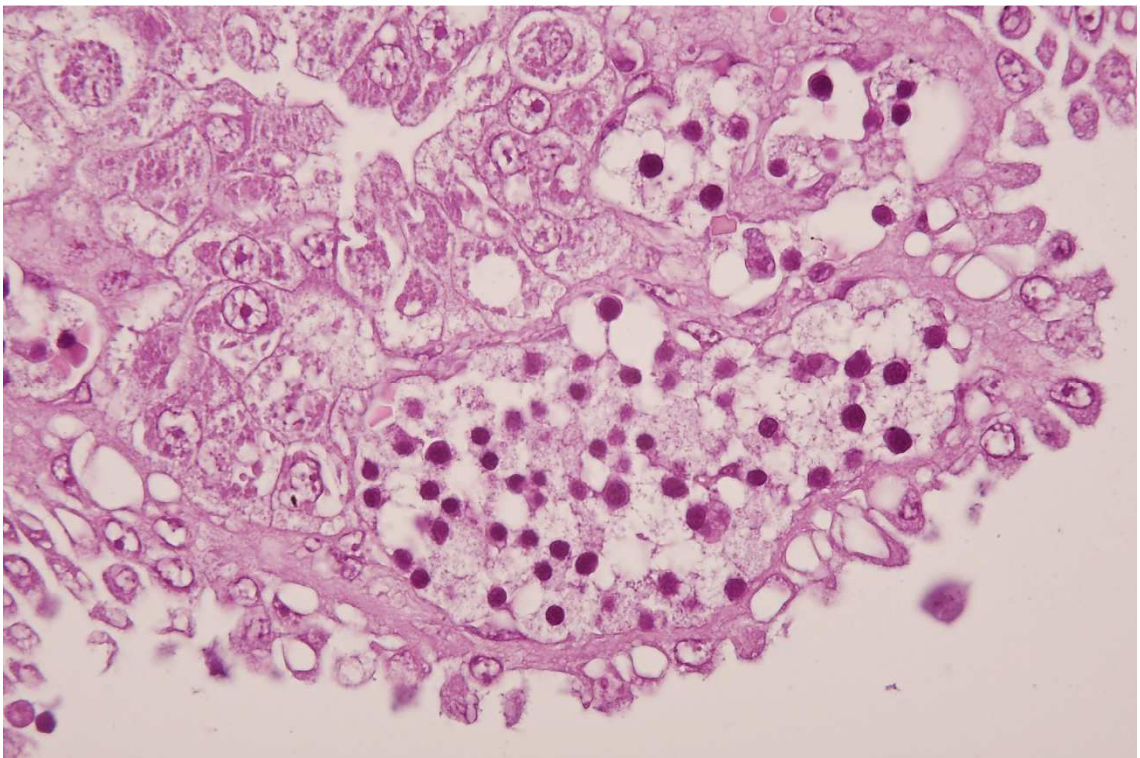


Figure 2. A small number of macrophages was observed in the vascular lumina obtained from placenta of cat no. 7 (HE 40X).



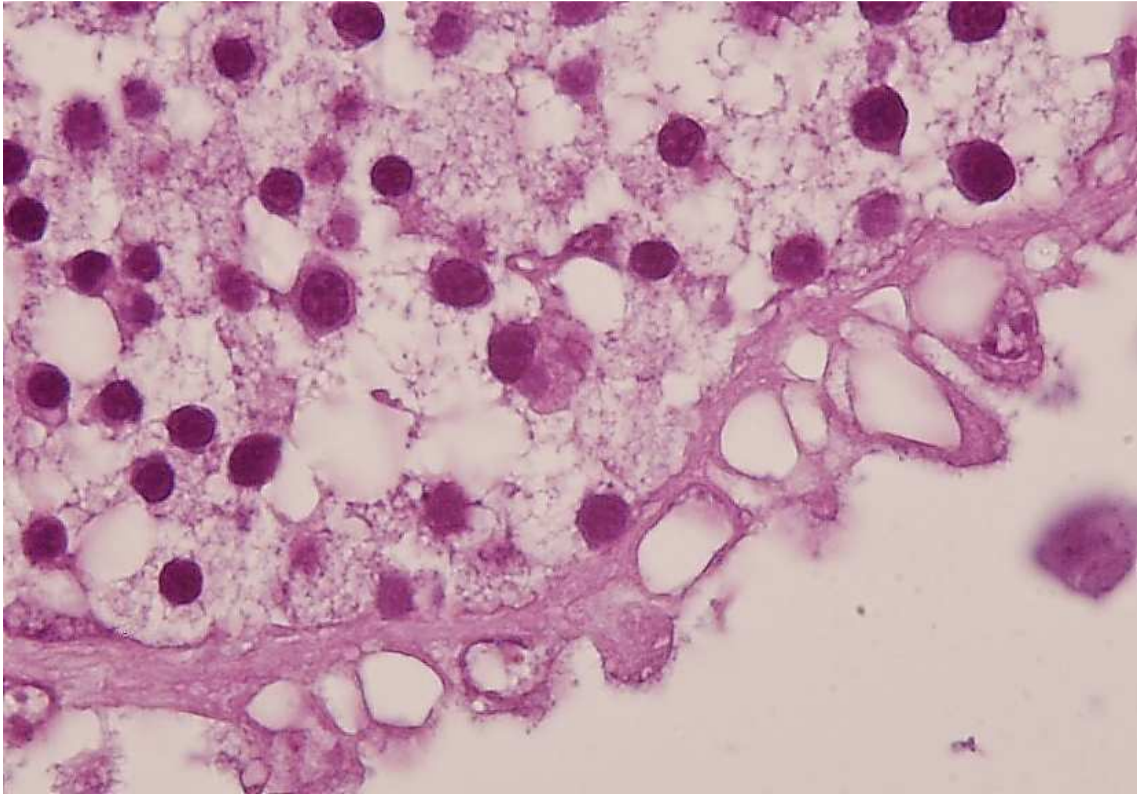


Figure 3. High magnification of figure 2: roundish vesicular bodies, suggestive of schizonts of *Cytosuxzoon* sp. were observed in the cytoplasm of some macrophages (HE, 100X)

## *Capitolo Quarto*

*Prevalenza di *Cytauxzoon* sp. in Italia,  
rilievi epidemiologici e fattori di rischio  
associati all'infezione*

In Europa *Cytauxzoon* sp. è stato descritto in un gatto e in alcune linci iberiche (*Lynx pardinus*) in Spagna (Criado-Fornelio et al., 2004; Luaces et al., 2005), in un gatto in Francia (Criado-Fornelio et al., 2009) e in un gruppo di gatti in Italia (Carli et al., 2012). I soggetti infetti identificati nel nostro territorio risiedevano tutti a Trieste dove è stato individuato un focolaio d'infezione ed è stata registrata una prevalenza del 23% (Carli et al., 2012, capitolo primo). La prevalenza dell'infezione riportata nelle linci iberiche che risiedono in Sierra Morena varia tra 26,95 e 33% (Millan et al., 2007; García-Bocanegra et al., 2010) mentre la prevalenza riportata nel gatto in Francia è dello 0,8% (Criado-Fornelio et al., 2009).

*Cytauxzoon* sp. è stato descritto soprattutto nelle linci giovani e nel periodo primavera-estate (Millan et al., 2007). Dai dati raccolti nello studio riportato nel capitolo primo, nel gatto è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra l'infezione da *Cytauxzoon* sp. e la vita in colonia o comunque uno stile di vita che preveda frequenti contatti con l'ambiente esterno. Non sono state trovate invece associazioni statisticamente significative tra infezione e razza, genere, età, presenza di zecche e/o pulci alla visita clinica, stato clinico, alterazioni di laboratorio come l'anemia, co-infezione FIV e/o FeLV e tasso di mortalità.

Gli obiettivi del lavoro di seguito descritto sono stati quelli di: 1) conoscere la prevalenza dell'infezione in Italia attraverso uno studio epidemiologico che ha coinvolto gatti che vivevano in aree del nordest, centro e sud Italia; 2)

individuare le associazioni tra l'infezione da *Cytauxzoon* sp. e segnalamento, stile di vita, contatti con gli ectoparassiti, presenza di co-infezione con FIV e/o FeLV e alterazioni clinico-patologiche, attraverso la valutazione delle informazioni raccolte dai gatti infetti e non infetti ottenute accorpando i dati dello studio epidemiologico con quelli di tutti i soggetti coinvolti negli studi presentati nei capitoli precedenti (capitolo primo, secondo e terzo).

## **Materiali e metodi**

### **Studio epidemiologico**

#### *Organizzazione della raccolta dei dati e selezione dei casi*

La raccolta dei dati è stata fatta nel periodo tra marzo 2010 e Gennaio 2012. Sono stati selezionati e contattati telefonicamente alcuni Medici Veterinari che svolgevano la loro professione in tre aree del nord (n=66), centro (n=9) e sud (n=20) Italia, ai quali è stato affidato il compito di raccogliere tra i loro pazienti i gatti da destinare allo studio.

E' stata quindi redatta una scheda (Figura 1) per la raccolta delle informazioni riguardanti segnalamento, anamnesi ambientale, stile di vita, contatto con ectoparassiti, segni clinici riscontrati alla visita e terapie in atto, da compilare per ciascun gatto. Ogni Veterinario ha ricevuto una mail con le indicazioni sulla modalità di raccolta e gestione dei campioni e copia della scheda.

I gatti sono stati scelti in maniera del tutto casuale tra i pazienti portati a visita (sani e sintomatici) che, per vari motivi, necessitavano di fare degli esami

di laboratorio. Ciascun soggetto è stato sottoposto a una visita clinica nell'ambito della quale sono stati raccolti un campione di sangue intero in K3EDTA e un campione di siero. In alcuni casi erano disponibili anche campioni di plasma in Na-citrato e di urine. Gli esami sono stati eseguiti presso il Laboratorio San Marco di Padova.

Ai fini di successive rivalutazioni o dell'esecuzione di altri accertamenti il materiale cartaceo e i vetrini sono stati archiviati, mentre il materiale biologico è stato stoccato in congelatore a -20°C.

#### *Esami di laboratorio*

L'esame emocromocitometrico (Cell Blood Count, CBC) è stato eseguito mediante contaglobuli automatico (ADVIA® 120 e ADVIA 2120®) in associazione con la valutazione di uno striscio ematico allestito a fresco al momento del prelievo e, se non disponibile, al momento della processazione del campione con una goccia di sangue in K3EDTA. Gli strisci ematici sono stati colorati con colorazione di Wright modificata con una coloratrice automatica (Aerospray slide stainer 7120, Delcon®). Il grado di parassitemia è stato espresso secondo il grading riportato in letteratura (Carli et al., 2012). Gli altri esami di laboratorio sono stati eseguiti come descritto da Furlanello et al. nel 2005 e Carli et al. nel 2012. I campioni sono stati processati entro 24 ore dalla raccolta.

Sono stati presi in considerazione anche i risultati dei test per la determinazione dell'anticorpo del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) e dell'antigene p27 del Virus della Leucemia Felina (FeLV) eseguiti a livello ambulatoriale con diversi kit presenti in commercio.

#### *Estrazione del DNA, PCR per il gene 18S rRNA e sequenziamento*

L'estrazione del DNA è stata eseguita sui campioni di sangue intero in K3EDTA mediante il kit High Pure Template Preparation (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) secondo le indicazioni del produttore e con alcune modifiche come riportato in letteratura (Carli et al., 2012).

I campioni positivi alla PCR per il gene 18S ribosomiale sono stati analizzati con sequenziamento diretto attraverso l'analizzatore Applied Biosystem 3730xl DNA Analyzer dalla BMR Genomics srl di Padova (Italia) mediante il metodo Sanger (Sanger et al., 1977). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GenBank® mediante un software dedicato (BLAST), un programma euristico per la ricerca di omologie locali di sequenza, costituito da diversi programmi, tra cui Blastn, qui utilizzato, che paragona una specifica sequenza nucleotidica ad un database di sequenze nucleotidiche.

### **Analisi statistica**

#### *Raccolta dati*

I dati raccolti da tutti i gatti coinvolti nei vari studi descritti nel capitolo primo, secondo e terzo sono stati accorpati a quelli dei soggetti inseriti nello

studio epidemiologico. Le informazioni concernenti segnalamento, anamnesi, stile di vita, contatti con ectoparassiti, condizioni cliniche, co-infezione da FIV/FeLV e i rilievi di laboratorio sono stati tabulati in un file Excel da destinare alla successiva analisi statistica. In tabella 1 sono riportati i parametri dei vari esami di laboratorio che sono stati presi in considerazione.

La prevalenza di *Cytauxzoon* sp. rispetto ai dati epidemiologici dei gatti è stata testata con il test del chi-quadro. Le differenze delle medie dei parametri ematologici, biochimici ed elettroforetici in relazione alla positività per *Cytauxzoon* sp. sono state testate con l'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di Tukey per le comparazioni fra più di due classi. Il software statistico utilizzato è stato SPSS per Windows, versione 13.0.

## **Risultati**

### **Studio epidemiologico**

Sono stati raccolti i dati di 154 gatti provenienti dal nord-est (n=119), dal centro (n=22) e dal sud (n=13) Italia. La valutazione morfologica dello striscio ematico e la PCR sui campioni di sangue hanno permesso di individuare quattro soggetti infetti da *Cytauxzoon* sp. che vivevano a Trieste, Venezia e Grosseto. In tabella 2 sono riassunte le informazioni segnaletiche, anamnestiche clinico-patologiche e i follow up riguardanti questi gatti. La prevalenza dell'infezione è stata pari a 2,59%.

## Analisi statistica

In totale sono stati raccolti i dati di 290 gatti dei quali 38 (13,1%) sono risultati positivi all'infezione da *Cytauxzoon* sp. I dati segnaletici e anamnestici non erano disponibili per tutti i soggetti. I gatti infetti erano europei (36/238, 15,3%) e di razza (2/238; 0,08%), maschi (11/239, 4,6%) e femmine (27/239, 11,3%), con età che andava da 0,5 a 14,1 anni (media  $\pm$ DS: 4  $\pm$  4,2 anni). Le tabelle 3 e 4 riassumono le prevalenze dell'infezione da *Cytauxzoon* sp. in relazione ai dati epidemiologici dei gatti, le medie dei valori dei parametri di laboratorio e le differenze significative.

L'infezione da *Cytauxzoon* sp. è significativamente associata alla giovane età ( $p < 0,01$ ), alla vita libera o semilibera ( $p < 0,01$ ), all'assenza di trattamenti atti a prevenire il contatto con gli ectoparassiti ( $p < 0,01$ ) e all'assenza di segni clinici alla visita ( $p < 0,05$ ). L'infezione non è statisticamente correlata con la provenienza (nord, centro o sud), la razza, il sesso, il contatto presente o passato con pulci e/o zecche, la co-infezione con FIV e FeLV e l'anemia. Non si osservano associazioni statisticamente significative per quanto riguarda i parametri di laboratorio ad eccezione di MCHC ( $p < 0,05$ ), PCT ( $p < 0,01$ ) e CPK ( $p < 0,01$ ).

In figura 2 sono riportate le zone in cui sono stati osservati i diversi casi di infezione da *Cytauxzoon* sp in Italia.



## Conclusioni

Dalla raccolta dei dati ottenuti con lo studio epidemiologico sono stati individuati tre nuovi casi di infezione, uno a Trieste, dove era già nota la presenza del patogeno (Carli et al., 2012), uno a Venezia e uno a Grosseto, città dove non era ancora stata segnalata la presenza di *Cytauxzoon* sp. Nel gatto è stata osservata, inoltre, una prevalenza dell'infezione pari a 2,59% in Italia, valore più elevato di quanto riportato precedentemente in Francia dove su 116 gatti solo uno è risultato infetto (prevalenza di 0,8%) (Criado-Fornelio et al., 2009).

In letteratura sono disponibili poche informazioni su segnalamento, segni clinici e parametri di laboratorio rilevati in corso d'infezione da *Cytauxzoon* sp. nel gatto. L'unico soggetto segnalato in Spagna presentava diminuzione di Hct e Hb, aumento della glicemia, degli enzimi epatici e dell'albumina (Criado-Fornelio et al., 2004). Le prime informazioni di tipo clinico e clinico-patologico ottenute da un gruppo di gatti infetti sono state raccolte dal focolaio di Trieste e descritte nel capitolo primo (Carli et al., 2012). L'analisi statistica di tutti i dati raccolti nel corso della ricerca oggetto di questa tesi ha confermato alcune delle associazioni osservate nel focolaio di Trieste (Carli et al., 2012, capitolo primo). Risulta confermato, infatti, che l'infezione da *Cytauxzoon* sp. si associa alla vita in colonia e/o ai frequenti contatti con l'ambiente esterno mentre non è statisticamente correlata con razza, sesso, contatto con pulci e/o zecche, coinfezione con FIV e/o FeLV e anemia. A differenza delle informazioni ottenute

nel focolaio, con l'analisi della totalità dei dati raccolti sono state individuate associazioni statisticamente significative tra infezione e giovane età, mancanza di trattamenti profilattici contro gli ectoparassiti e assenza di segni clinici alla visita clinica. Inoltre non sono state osservate associazioni statisticamente significative con provenienza (nord, centro o sud) e con la maggior parte dei parametri di laboratorio analizzati ad eccezione di MCHC, PCT e CPK. Queste osservazioni vanno a supporto dell'ipotesi che l'infezione da *Cytauxzoon* sp. nel gatto abbia più spesso un andamento subclinico.

### Bibliografia

- Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., Furlanello, T., Millotti, A., Caldin, M., Solano-Gallego, L., 2012. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Vet. Parasitol.* 183, 343-352.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73-76.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134, 77-85.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010. Factor affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. Parasitol.* 167, 36-42.

Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galca, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). J. Wildl. Dis. 41, 810-815.

Millan, J., Naranjo, V., Rodriguez, A., de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. Parasitology 134, 995-1001.

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

Tabella 1. Parametri di laboratorio presi in considerazione per l'analisi statistica

ESAME DI LABORATORIO	PARAMETRI SOTTOPOSTI AD ANALISI STATISTICA
ESAME EMOCROMOCITOMETRICO	<p>RBC (eritrociti), Hct (ematocrito), Hbg (emoglobina), MCV (volume cellulare medio), MCH (emoglobina cellulare media), MCHC (concentrazione cellulare media dell'emoglobina), RDW (ampiezza di distribuzione dei volumi eritrocitari), HDW (ampiezza di distribuzione dell'emoglobina);</p> <p>WBC (globuli bianchi), neutrofilii segmentati (n° assoluto), linfociti (n° assoluto), monociti (n° assoluto), eosinofili (n° assoluto), basofili (n° assoluto);</p> <p>PLT (piastrine), MPV (volume piastrinico medio), PCT (piastrinocrito), PDW (ampiezza di distribuzione del volume piastrinico), MPC (complessità piastrinica)</p>
PROFILO BIOCHIMICO	<p>CPK (creatininfosfochinasi), AST (aspartato transaminasi), ALT (alanina transaminasi), ALP (fosfatasi alcalina), GGT (gamma glutamil transferasi), bilirubina, proteine totali, albumina, globuline, colesterolo, trigliceridi, urea, creatinina, glucosio, Ca, P, Mg, Na, K, Cl, Fe, UIBC, TIBC (capacità totale di legare il ferro), SAA (siero amiloide A)</p>
ELETTROFORESI	<p>Albumina, alfa1-globuline, alfa2-globuline, beta-globuline, gamma-globuline</p>

Tabella 2. Segnalamento, anamnesi, stile di vita, segni clinici, alterazioni clinico-patologiche, follow up e provenienza dei quattro gatti infetti individuati nello studio epidemiologico e del caso osservato a conclusione di questo

SEGNALAMENTO <sup>a</sup>	ANAMNESI E STILE DI VITA	SEGNI CLINICI	ALTERAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE <sup>p</sup>	FOLLOW UP	PROVENIENZA
Gatto n° 1: E, M, 12,8 anni	Addottato da una colonia, vive in casa, profilassi per ectoparassiti irregolare; FIV e FeLV negativo	PU/PD e dispnea	Aumento WBC, neutrofili, monociti, ALT, AST, glucosio, SAA, alfa1-globuline Diminuzione P	Morto dopo pochi giorni dalla diagnosi	Venezia
Gatto n° 2: E, F, 7 anni	Addottato da una colonia, vive in casa e all'esterno, profilassi per ectoparassiti assente; FIV e FeLV negativo	Anoressia, atassia, ottundimento del sensorio, perdita del controllo treno posteriore, barcollamento, riflessi propiocettivi rallentati	Aumento neutrofili, monociti, CPK, AST, GGT, globuline, SAA, alfa1-globuline, beta-globuline. Sierologia IgG per <i>Toxoplasma gondii</i> 1:320	Dopo terapia con clindamicina, miglioramento della sintomatologia	Trieste
Gatto n° 3: P, M, 12 anni	Vive in casa e all'esterno, profilassi per ectoparassiti assente	Polifagia, dimagrimento, diarrea	Anemia moderata normocitica normocromica. Aumento leucociti, neutrofili, monociti, piastrine, GGT, bilirubina, Diminuzione albumina, glucosio, beta-globuline	Sconosciuto	Grosseto
Gatto n° 4: E, F, 5 anni	Addottato da una colonia, vive in casa, profilassi per ectoparassiti irregolare; FIV e FeLV negativo	Atassia grave al posteriore	Aumento CPK, glucosio,	Trattato con atovaquone e azitromicina senza risoluzione dell'infezione	Trieste

<sup>a</sup>E: Europeo, P: persiano F: femmina, M: maschio;

Tabella 3. Prevalenza dell'infezione da *Cytauxzoon* sp. in relazione ai dati epidemiologici dei gatti e differenze significative (P)

FATTORE	TOT ESAMINATI	INFETTI	(%)	P
<b>PROVENIENZA</b>				
NORD	219	35	15,9%	ns
CENTRO	21	3	14,2%	
SUD	13	0	0,0%	
<b>RAZZA</b>				
EUROPEO	208	36	17,3%	ns
ALTRE RAZZE	30	2	6,6%	
<b>SESSO</b>				
FEMMINA	144	27	16,6%	ns
MASCHIO	95	11	11,5%	
<b>ETÀ (MESI)</b>				
< 15	50	19	38%	< 0,01
15-72	68	10	14,7%	
72-144	64	7	10,9%	
> 144	71	2	2,8%	
<b>STILE DI VITA</b>				
GATTO DI PROPRIETÀ	183	16	8,7%	< 0,01
GATTO RANDAGIO	56	22	39,2%	
<b>TRATTAMENTO PER ECTOPARASSITI</b>				
REGOLARE	38	0	0,0%	< 0,01
IRREGOLARE	46	4	8,6%	
ASSENTE	4	1	25,0%	
<b>CONTATTO CON PULCI (alla visita o in passato)</b>				
NO	120	26	21,6%	ns
SI	73	7	9,5%	
<b>CONTATTO CON ZECHE (alla visita o in passato)</b>				
NO	166	28	16,8%	ns
SI	25	5	20%	
<b>FIV</b>				
NO	129	30	23,2%	ns
SI	16	2	12,5%	
<b>FELV</b>				
NO	127	30	23,6%	ns
SI	17	2	11,7%	
<b>SEGNI CLINICI</b>				
NO	74	23	31%	< 0,05
SI	118	15	12,7%	
<b>ANEMIA</b>				
NO	195	25	12,8%	ns
SI	48	12	25%	

ns: non significativo

Tabella 4. Medie dei valori di alcuni parametri di laboratorio in relazione alla positività per *Cytauxzoon* sp. e differenze significative

PARAMETRO	INTERVALLO DI RIFERIMENTO	PCR CYTAUXZOOON SP.	n° GATTI	MEDIA	VALORE MINIMO	VALORE MASSIMO	P
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	6,35-9,50	neg	243	7,5012	1,13	17,93	ns
		pos	36	7,2119	3,89	10,94	ns
HBG (g/dL)	9,6-14,3	neg	243	10,6638	1,80	21,00	ns
		pos	37	10,3459	5,50	14,70	ns
HCT (%)	28,0-42,5	neg	243	33,9749	5,10	52,50	ns
		pos	37	32,4811	19,70	46,50	ns
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	5,0-11,0	neg	243	12,4673	0,16	65,30	ns
		pos	37	13,5349	4,09	36,30	ns
NEUTROFILI (μL)	2500-7000	neg	243	8466,3169	48,00	62035,00	ns
		pos	37	9251,2432	1556,00	32670,00	ns
LINFOCITI (μL)	1300-5500	neg	243	2716,0634	9,40	10472,00	ns
		pos	37	3062,2703	575,00	7104,00	ns
PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	130-430	neg	245	319,3714	43,00	1216,00	ns
		pos	35	340,5714	42,00	784,00	ns
PCT (%)	0,20-0,50	neg	243	0,5118	0,03	4,00	< 0,01
		pos	37	0,6922	0,15	1,40	ns
CPK (UI/L)	90-320	neg	193	264,5285	23,00	3154,00	< 0,01
		pos	13	1301,5385	53,00	9728,00	ns
ALT (UI/L)	32-87	neg	194	104,9227	10,00	1611,00	ns
		pos	13	57,5385	10,00	192,00	ns
ALP (UI/L)	19-70	neg	193	44,7617	5,00	1254,00	ns
		pos	13	31,0769	3,00	109,00	ns
BIL TOT (mg/dL)	0,14-0,26	neg	193	0,6169	0,01	11,43	ns
		pos	13	0,2023	0,02	,52	ns
PROT TOT (mg/dL)	6,3-7,8	neg	194	9,0665	2,20	312,00	ns
		pos	13	7,1385	5,10	8,90	ns
ALBUMINA (g/dL)	3,0-4,0	neg	193	2,9223	0,30	4,50	ns
		pos	13	2,8692	1,70	3,60	ns
COLESTEROLO (mg/dL)	95-210	neg	192	152,7969	58,00	333,00	ns
		pos	12	165,1667	69,00	293,00	ns
UREA (mg/dL)	32-64	neg	194	86,2835	20,00	830,00	ns
		pos	13	81,3846	25,00	253,00	ns
CREATININA (mg/dL)	0,95-1,85	neg	194	2,1261	0,10	22,28	ns
		pos	13	1,7723	0,83	5,19	ns
GLUCOSIO (mg/dL)	86-116	neg	194	133,6552	4,10	514,00	ns
		pos	13	159,5385	60,00	328,00	ns
CALCIO (mg/dL)	9,3-11,2	neg	193	9,5161	6,50	11,50	ns
		pos	12	9,2667	6,70	10,90	ns
SODIO (mg/dL)	145-152	neg	192	150,2182	2,90	161,00	ns
		pos	13	148,4846	133,00	165,00	ns
POTASSIO (mg/dL)	3,5-4,7	neg	192	4,3339	2,00	52,10	ns
		pos	13	4,5000	4,00	5,10	ns
SAA (μg/mL)	0,1-0,5	neg	182	31,0670	0,10	232,00	ns
		pos	13	31,4262	0,04	252,50	ns
GLOB ALFA 1 (%)	0,8-1,6	neg	192	18,4375	3,50	38,80	ns
		pos	13	19,2385	13,40	50,50	ns
GLOB BETA (%)	6,4-9,4	neg	192	16,4609	2,90	48,60	ns
		pos	13	17,2154	12,20	35,10	ns

NOME AMBULATORIO		DATA	
<b>SEGNALAMENTO</b>		NOME	RAZZA
	MANTELLO		ETA'
	SESSO M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		
<b>PROVENIENZA</b>		ALLEVAMENTO/NEGOZIO <input type="checkbox"/>	FAMIGLIA <input type="checkbox"/>
	COLONIA <input type="checkbox"/>		SCONOSCIUTA <input type="checkbox"/>
	GATTILE <input type="checkbox"/>		
GATTO DI PROPRIETA' <input type="checkbox"/>		GATTO RANDAGIO <input type="checkbox"/>	
VIVE IN	CASA <input type="checkbox"/>	VIVE IN	CITTA' <input type="checkbox"/>
	CASA/AMBIENTE ESTRERNO <input type="checkbox"/>		CAMPAGNA <input type="checkbox"/>
	AMBIENTE ESTRERNO <input type="checkbox"/>		COLLINA/MONTAGNA <input type="checkbox"/>
VIVE	SOLO <input type="checkbox"/>	CON ALTRI GATTI (indicare il numero) <input type="checkbox"/>	
	CON CANI <input type="checkbox"/>	CON ALTRI ANIMALI (specificare quali) <input type="checkbox"/>	
<b>ECTOPARASSITI</b>			
TRATTAMENTO PER GLI ECTOPARASSITI		SI, REGOLARE <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
		SI, IRREGOLARE <input type="checkbox"/>	SCONOSCIUTO <input type="checkbox"/>
PRODOTTO IMPIEGATO			
PRESENZA DI PULCI	AL MOMENTO DELLA VISITA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
	IN PASSATO	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
PRESENZA DI ZECCHE	AL MOMENTO DELLA VISITA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
	IN PASSATO	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
<b>TEST FIV/FeLV</b>		DATA ESECUZIONE DEL TEST	NON ESEGUITO <input type="checkbox"/>
TIPO DI TEST			
FIV	POSITIVO <input type="checkbox"/>	NEGATIVO <input type="checkbox"/>	
FeLV	POSITIVO <input type="checkbox"/>	NEGATIVO <input type="checkbox"/>	
<b>SEGNI CLINICI/ALTERAZIONI DI LABORATORIO</b>		GATTO SANO <input type="checkbox"/>	GATTO MALATO <input type="checkbox"/>
TERAPIE FARMACOLOGICHE IN CORSO _____			
BREVE DESCRIZIONE DELLE ALTERAZIONI RICONTRATE			
_____			
_____			
_____			

Figura 1. Scheda per la raccolta dei dati segnaletici, anamnestici e clinici dei gatti coinvolti nello studio epidemiologico.








-  Capitolo primo (focolaio)
-  Capitolo secondo
-  Capitolo quarto (studio epidemiologico)

Figura 2. Localizzazione dei casi di infezione da *Cytauxzoon* sp. identificati in Italia

# *Capitolo Quinto*

## *Discussione generale*

In questo lavoro, è stato possibile descrivere per la prima volta la presenza di *Cytauxzoon* sp. in Italia nei gatti domestici (prevalenza pari a 2,59%). In particolare è stato individuato un focolaio d'infezione a Trieste e sono stati osservati altri casi a Viterbo, Venezia e Grosseto. La diagnosi è stata fatta mediante valutazione morfologica dello striscio ematico, PCR e sequenziamento. E' stata osservata un'omologia del 93% con *C. felis* e del 99% con *Cytauxzoon* sp. descritto in Spagna, Francia e Mongolia. *Cytauxzoon* presente in Italia è, dal punto di vista molecolare, simile a *C. felis*, il protozoo più noto e descritto negli Stati Uniti, ma non è completamente sovrapponibile. Ciò va a supporto dell'ipotesi che *Cytauxzoon* sp. abbia una relazione di tipo "sister group" con *C. felis* come precedentemente riportato negli studi pubblicati sui casi europei e mongoli.

La valutazione dei dati raccolti dai soggetti infetti ha permesso di aggiungere nuove informazioni rispetto alle scarse disponibili in letteratura su questa infezione nel gatto. *Cytauxzoon* sp. sembra infettare principalmente i gatti di colonia o comunque che vivono liberi o che hanno frequenti e prolungati contatti con l'ambiente esterno (dato statisticamente significativo). Per la maggior parte i soggetti infetti sono apparentemente sani e hanno parassitemie lievi, sporadicamente associate ad anemia. Più raramente, sono stati osservati gatti che presentavano segni clinici e alterazioni di laboratorio. E' stata formulata quindi l'ipotesi che l'infezione da *Cytauxzoon* sp., nel gatto, abbia un andamento di tipo subclinico nella maggior parte dei casi e che questo

patogeno, nei felini domestici, possa essere meno virulento rispetto a *C. felis*. E' possibile che la patogenesi dell'infezione sia più simile a quella sostenuta da *C. felis* nei felini selvatici, caratterizzata da parassitemie croniche e persistenti e più raramente da malattie conclamate. I gatti osservati, infatti, sono spesso persistentemente parassitemici e asintomatici. L'anemia non è statisticamente associata alla presenza di *Cytauxzoon* sp. L'assenza di anemia nella maggior parte dei soggetti infetti è una peculiarità di questa infezione e una differenza rispetto all'infezione da *C. felis* dove è presente anemia nella la maggior parte dei gatti ammalati. Le caratteristiche dell'infezione da *Cytauxzoon* sp. finora riportate fanno del gatto un potenziale reservoir per questo patogeno e lo rendono una possibile fonte di parassita per i vettori coinvolti nel ciclo biologico.

L'analisi dei dati di laboratorio non ha messo in evidenza associazioni statisticamente significative per la maggior parte dei parametri come descritto anche per i gatti che sopravvivono all'infezione da *C. felis*. Solo il CPK mostra un aumento statisticamente significativo che, nei casi considerati, potrebbe essere associato alla giovane età della popolazione di gatti esaminata, infatti la maggior parte dei soggetti infetti aveva meno di 15 mesi.

Riguardo alle modalità di trasmissione di questo protozoo, in letteratura non ci sono informazioni. Nel presente lavoro sono stati descritti, per la prima volta in una gatta infetta, inclusi tissutali compatibili con gli schizonti di *Cytauxzoon* sp. che sono stati individuati nei fagociti mononucleati a livello di

placenta e soprattutto nel tessuto muscolare fetale. Questa osservazione ha fatto ipotizzare che la via verticale possa essere una modalità di trasmissione del patogeno. Ciò rappresenta una novità nella patogenesi dell'infezione: infatti, per *C. felis* non è mai stata documentata la trasmissione verticale, anche se gli Autori ritengono che, seppur raramente, possa essere una modalità plausibile.

E' stato osservato inoltre che l'infezione colpisce soprattutto gatti di giovane età (<15 mesi) e questo dato è risultato statisticamente significativo. Il gatto infetto più giovane aveva sei mesi. Nella valutazione di questo rilievo va considerato che una parte della popolazione felina studiata era costituita da gatti indagati in occasione di procedure di sterilizzazione, che generalmente si fanno nei soggetti giovani. Non sono state osservate correlazioni statisticamente significative con la razza, il sesso e la co-infezione con FIV e/o FeLV.

Le indagini molecolari eseguite sulle pulci (*Ctenocephalides felis*) e le zecche (*Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus*) isolate dai gatti che vivevano nel focolaio di Trieste non hanno dato esito positivo per *Cytauxzoon* sp., indipendentemente dal fatto che gli ectoparassiti fossero raccolti dai gatti infetti. Ciò non esclude che questi vettori possano essere coinvolti comunque nel ciclo biologico del parassita e/o che altre specie possano giocare un ruolo importante nella trasmissione. Saranno necessari altri studi per approfondire le conoscenze su questo aspetto.

Un protocollo terapeutico sicuramente efficace nell'eliminazione di *C. felis* non è ancora stato individuato. In un gattino infetto da *Cytauxzoon* sp. è stata

messa in atto una terapia a base di doxiciclina e imidocarb dipropionato che ha dato esito positivo, dal momento che nelle successive indagini molecolari non è più stato rilevato il patogeno. Un secondo gatto che ha iniziato lo stesso trattamento, ma non lo ha terminato, è rimasto infetto. Non si può escludere che il successo terapeutico sia stato casuale o che si sia abbassata la carica parassitaria sotto i limiti diagnostici della PCR. Servirà trattare e monitorare altri soggetti per capire se la terapia proposta possa essere realmente efficace.

Saranno necessari altri studi e ulteriori approfondimenti (valutazioni cliniche, indagini molecolari basate su altri geni come ad esempio ITS1 e ITS2, individuazione dei vettori e dei reservoir d'infezione) per confermare e integrare le informazioni su *Cytauxzoon* sp. raccolte con questo lavoro.

In conclusione, le nuove informazioni che questo studio ha fornito possono essere così riassunte:

- 1) in Italia è presente *Cytauxzoon* sp. nelle zone centrali e in particolare nel nordest, dove esiste un focolaio nella città di Trieste;
- 2) questo patogeno nel gatto è responsabile d'infezione soprattutto nei soggetti giovani che conducono vita libera o semilibera;
- 3) i gatti infetti hanno più spesso infezioni subcliniche caratterizzate da parassitemie persistenti e assenza di sintomi, come ad esempio l'anemia, mentre le forme sintomatiche sono estremamente rare;
- 4) è possibile che una delle vie di trasmissione dell'infezione sia quella verticale.