

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS - BOTUCATU**

**ESTUDO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Babesia spp. EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

VIVIANE VON AH LOPES

Botucatu - SP

06/2006

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS - BOTUCATU**

**ESTUDO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Babesia spp. EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

VIVIANE VON AH LOPES

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista, Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre na área de Clínica Veterinária.**

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

Botucatu - SP

06/2006

VIVIANE VON AH LOPES

**ESTUDO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Babesia spp. EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

Aprovada em 29 de junho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Profa. Adjunto Teresa Cristina Goulart de Oliveira-Sequeira

Prof. Dr. Vamilton Álvares Santarém

Botucatu - SP

2006

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio que me foi dado e pela confiança que depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo;

Aos meus pais, Pedro e Rosangela, por me darem um amor incondicional e me ensinarem a nunca desistir de meus sonhos, e aos meus irmãos Daniela e Vitor, por todo o carinho;

À Lucia, minha orientadora, por me aceitar como orientada e ter me apoiado em todas as ocasiões e pela grande ajuda na execução desse trabalho, sempre confiando na minha capacidade;

Ao Adriano Rubini, amigo e companheiro de mestrado, um cara de sorte, pelos inesquecíveis churrascos da Parasito e das horas intermináveis de cantoria;

À Karina Paduan, por toda paciência e disposição na realização do seqüenciamento e análise dos dados. Nem tenho palavras para agradecer;

Ao Dr. Paulo Ribolla, por me ceder diversas vezes o material necessário e por permitir o uso do seu laboratório, e aos seus orientados, Jayme, Aline, Letícia, Diego, Alberto e Bianca;

À Dra Teresa Cristina, por me emprestar seu laboratório para a realização deste experimento, e ao seu orientado Gustavo Cavalcanti, pela grande ajuda neste projeto;

Ao Vamilton Álvares Santarém e Cecília Laposy, sem os quais eu provavelmente não teria escolhido esse caminho;

Ao professor Reinaldo, pelo analisador de imagens e pela ajuda para editar as imagens;

Aos professores Luciene e Wesley, pela análise estatística;

Ao Alexandre Garcia de Sá, por ceder uma alíquota dos oligonucleotídeos utilizados;

Ao Hospital Veterinário da UNOESTE, pela utilização do laboratório para processamento das amostras coletadas em Presidente Prudente;

Ao Dr. João Pessoa, que sempre me atendeu quando eu precisei e pelas sugestões dadas, e a seu orientado Tiago Batista, pela realização da PCR das amostras usadas como controle positivo;

Às amigas especiais e que eu tanto amo Telma Paparotto, Satie Katagiri e Karina Santos, presente em todos os momentos alegres ou tristes, sempre me dando apoio e um ombro amigo;

Ao Marco Rosselini, Marcella Carneiro, Luciana Machado, Mere Saito, Andreza, Gabriel Garrido e Aline Augusti, companheiros de todas as horas e pra toda vida;

Ao Pedro Paulo, uma pessoa encantadora, por toda a boa vontade em ajudar e sempre com um sorriso nos lábios;

Ao Camilo Bulla, um amigo que eu “considero pracaramba” e de quem eu tenho muito orgulho e admiração;

Ao meu tio Ivan Moreira e a Fernanda, por me ajudarem na coleta de sangue dos cães em Presidente Prudente;

Ao Oswaldo e Enide

por me acolherem como filha em sua casa e por todo carinho e incentivo dados à mim;

Aos meus amigos “botucudos” Silas, Josué e Levi, que me ensinaram o grande valor que cada pessoa possui;

À Nilza, Márcia, Roberto, Valdir e Angela, funcionários do departamento, pessoas muito prestativas e acolhedoras;

A todas as outras pessoas, não menos importantes, que passaram por minha vida deixando um pouco de si e levando um pouco de mim.

"Transforma as pedras que você tropeça nas pedras de sua
escada"

Sócrates

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Exemplo de residência visitada para exame de cães de áreas rurais do estado de São Paulo.....**27**
- FIGURA 2.** A. Merozoítos de *Babesia canis vogeli* (seta) observados em lâmina de esfregaço sangüíneo do sangue capilar de um cão (1.000X). B. Eritrofagocitose de uma hemácia parasitada por *B. c. vogeli* (seta) observada em esfregaço sangüíneo (1.000X)**35**
- FIGURA 3.** Resultado da PCR de sete amostras positivas. Observam-se fragmentos de 450 pb (linhas 3, 5, 7 e 8) correspondentes a amplificação do DNA de *Babesia* spp. (B) e fragmentos de 520 pb (linhas 2, 4 e 6) correspondentes a amplificação do DNA de *Hepatozoon* spp. (H). PM é padrão de 100 pb..... **36**
- FIGURA 4.** Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Os sítios polimórficos são evidenciados pela ausência do símbolo (*). Os símbolos (-) representam a ausência de nucleotídeos (gaps).....**40**
- FIGURA 5.** Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene rDNA de *Babesia* spp. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Babesia canis* obtidas no GenBank foram utilizadas como outgroup. (USA, Egypti, Okinawa, Brazil). 10- amostra de *B. c. vogeli* de um cão de área rural do estado de São Paulo.....**41**

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Freqüência de <i>Babesia</i> spp. em cães no Brasil, de acordo com a localidade e a técnica de diagnóstico.....	12
--	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição dos carrapatos encontrados em 36 de 150 cães de áreas rurais do estado de São Paulo, de acordo com o município.....**38**

TABELA 2. Porcentagem de animais positivos para *Babesia* diagnosticados pelas técnicas de esfregaço sangüíneo e de PCR em função do município de origem.....**38**

TABELA 3. Relação entre a ocorrência de *Babesia* spp. diagnosticada pela técnica de PCR e a presença de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães de áreas rurais de São Paulo.....**39**

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Do inglês “Enzyme-Linked Imunosorbent Assay”
g	Força gravitacional
M	Molar
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	Do inglês “Polimerase Chain Reaction”
PCR-RFLP	Do inglês “ Restriction Fragment Length Polymorphism”
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unidade internacional de medida

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Histórico.....	05
2.2 Etiologia.....	06
2.3 Epidemiologia.....	09
2.4 Ciclo.....	13
2.5 Patogenia.....	13
2.6 Sinais clínicos.....	14
2.7 Diagnóstico.....	16
2.7.1 Diagnóstico molecular de <i>Babesia</i> spp. de cães.....	18
2.8 Resposta a Terapia.....	22
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Seleção dos animais.....	27
4.2 Colheita de sangue.....	27
4.3 Colheita e identificação dos carrapatos.....	28
4.4 Local da realização do experimento.....	28
4.5 Acondicionamento das amostras.....	28
4.6 Processamento das amostras.....	28
4.7 Extração do DNA genômico.....	29
4.8 Obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	30
4.9 Reação em Cadeia da Polimerase.....	30
4.10 Eletroforese em gel de agarose.....	31
4.11 Purificação dos produtos da PCR.....	31
4.12 Reação de seqüenciamento.....	32
4.13 Precipitação.....	32
4.14 Análise das seqüências	33
4.15 Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS	34

5.1 Esfregaço sangüíneo.....	35
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	35
5.3 Carrapatos coletados.....	37
5.4 Comparação de dados.....	38
5.5 Seqüenciamento das amostras.....	39
5.6 Árvore Filogenética.....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

Lopes, V.V.A. Estudo parasitológico e molecular da infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo. Botucatu, 2006. 61f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Com o objetivo avaliar a epidemiologia e a característica molecular da infecção de cães de áreas rurais por *Babesia* spp., amostras de sangue de 150 animais foram coletadas e analisadas por esfregaço sangüíneo e por PCR. Além disso, os cães foram examinados para investigar possível infestação por carrapatos. Pelo esfregaço sangüíneo de sangue capilar (ponta de orelha) foram detectados três (2%) cães positivos e pela PCR para *Babesia* spp. 12 (8%) deles foram positivos, com bandas visualizadas em 450 pb. Foram encontrados *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. em 36 (24%) dos 150 cães. As espécies de *Amblyomma* detectadas foram *A. cajennense* (9/36 – 25%), *A. ovale* (8/36 - 22,2%) e *A. aureolatum* (1/36 - 2,7%). Um espécime de *Amblyomma* (1/36 – 2,7%) não pôde ser identificado especificamente pois se encontrava no estágio de ninfa. Não houve uma associação positiva entre o encontro de *R. sanguineus* e infecção por *B. canis*. O seqüenciamento de uma amostra positiva demonstrou identidade com *B. canis vogeli* já caracterizada no Brasil.

ABSTRACT

Lopes, V.V.A. Parasitologic and molecular study of *Babesia* spp. infection in dogs of rural areas from São Paulo state, Brazil. Botucatu, 2006. 61f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

In order to study the parasitologic and morphological characteristics of *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas, 150 animals were examined by blood smears and by PCR. Besides, the dogs were examined to investigate ticks infestation. By the blood smear of capillary blood (ear tip) examination, three (2%) were detected positive and by PCR for *Babesia* spp. 12 (8%) were positive, with bands visualized in 450 bp. *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma* spp. were found in 36 (24%) of the 150 dogs. The found species of *Amblyomma* were *A. cajennense* (9/36 - 25%), *A. ovale* (8/36 - 22.2%) and *A. aureolatum* (1/36 - 2.7%). A specimen of *Amblyomma* (1/36 - 2.7%) was found in the nymph stage and could not be identified. There was not a positive association between the encounter of *R. sanguineus* and the infection for *B. canis*. The sequencing of two positive samples demonstrated close identity with *B. canis vogeli* already characterized in Brazil.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Babesia* são parasitos intraeritrocíticos transmitidos por carrapatos e que infectam vários hospedeiros vertebrados, podendo causar doença severa em animais domésticos, silvestres e no homem (RISTIC, 1988).

Em cães, uma grande e uma pequena *Babesia* são descritas, *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, respectivamente (PASSOS et al., 2005). Três subespécies de grande *Babesia* são reconhecidas, *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (UILENBERG et al., 1989). Porém, atualmente discute-se se essas subespécies devem ser consideradas espécies verdadeiras (CARRET et al., 1999).

A distinção entre as duas espécies de *Babesia* de cães era tradicionalmente baseada na especificidade do hospedeiro e na morfologia das formas intraeritrocíticas, já que apresentam considerável diferença de tamanho. Dessa forma, grandes babesias eram caracterizadas como *B. canis* e pequenas babesias, como *B. gibsoni*. Esse critério de caracterização era fundamentado na hipótese de que nenhuma outra espécie de *Babesia* infectava os cães (CACCIÒ et al., 2002).

Nos últimos anos, foi questionada a caracterização dos isolados de *B. canis* derivados de diferentes regiões geográficas. Das babesias isoladas em cães infectados ao redor do mundo, importante heterogeneidade tem sido observada em relação à especificidade do vetor, sorologia e patogenicidade, além de não apresentarem uma imunidade cruzada entre si (UILENBERG et al., 1989; HAUSCHILD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997).

O diagnóstico molecular de *Babesia* spp. tem demonstrado que a especificidade de piroplasmídeos pelos hospedeiros é menor do que se supunha anteriormente e somente o uso de técnicas sensíveis de diagnóstico poderiam caracterizar com precisão as espécies (JEFFERIES et al., 2003).

No Brasil, Passos et al. (2005) identificaram pela primeira vez *B. c. vogeli*. Sá et al. (2006) e Diniz¹ (2005) também encontraram *B. c. vogeli* como sendo a única subespécie acometendo os cães estudados.

Rhipicephalus sanguineus, vetor responsável pela transmissão desse agente (REGENDANS & MUNIZ, 1936), é altamente prevalente em áreas urbanas onde a *Babesia* em cães é endêmica. Já em áreas rurais, onde o *R. sanguineus* é menos comum, mais estudos epidemiológicos são necessários para um melhor entendimento da transmissão desse parasito em cães (PASSOS et al., 2005).

Diante do exposto, o estudo da infecção por *Babesia* em cães de áreas rurais no Brasil se faz necessário para verificarmos a frequência e importância da infecção nesses animais e assegurar se realmente existe apenas uma única espécie de *Babesia* parasitando os cães, já que a diferenciação específica de *Babesia* não tem apenas interesse acadêmico, mas também, em relação a sintomatologia, prognóstico, tratamento e vacinação (BIRKENHEUER et al., 2003a; PASSOS et al., 2005).

¹ DINIZ, P. P. V. P. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu). Comunicação Pessoal, 2005.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Parasitas do gênero *Babesia* foram primeiramente reconhecidos por Babés (1888). Nesta época, o pesquisador procurava determinar a causa de uma doença grave que estava acometendo os bovinos no delta do rio Danúbio, na Romênia. O autor chegou à conclusão que o agente etiológico que estava provocando a enfermidade, denominada hemoglobinúria enzoótica, era um pequeno organismo cocóide, intraeritrocítico, por ele chamado *Haematococcus bovis*. Posteriormente, Starcovici (1893), um dos pesquisadores do grupo de Babés, reavaliou o parasito, denominando-o *Babesia bovis*, em homenagem a seu descobridor.

Nesse mesmo ano, Smith & Kilborne (1893), ao estudarem a etiologia da febre do Texas, na América do Norte, concluíram que se tratava de um agente semelhante ao parasito descrito por Babés, porém denominaram-no de *Pyrosoma bigeminum* desconsiderando a denominação prévia dada por Starcovici para parasitas do mesmo gênero. Esses pesquisadores estabeleceram pela primeira vez a relação da transmissão de um protozoário patogênico por um artrópode, no caso o ixodídeo *Boophilus annulatus*. Essa descoberta abriu um enorme campo de pesquisa sobre o papel desempenhado pelos artrópodes na transmissão de inúmeros patógenos, incluindo *Plasmodium* spp.

Babesia canis foi descrita pela primeira vez por Piana & Galli-Valerio em 1895, na Itália. A doença provocada nos cães era conhecida como “Malignant jaundice” e “Malignant malarial fever” (WENYON, 1926). A partir dessa descrição, a espécie foi observada na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte e América do Sul (RISTIC, 1988).

Babesia gibsoni foi descrita pela primeira vez na Índia, em 1910, por Patton (WENYON, 1926).

2.2 ETIOLOGIA

Protozoários do gênero *Babesia* pertencem ao Filo Protozoa, Subfilo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Piroplasmida e Família Babesiidae (LEVINE, 1984). São parasitos intraeritrocíticos transmitidos por carrapatos e que infectam vários hospedeiros vertebrados, podendo causar doença severa em animais domésticos, silvestres e no homem (RISTIC, 1988).

Classicamente, os cães podem ser acometidos por uma espécie de grande *Babesia*, *B. canis*, que mede aproximadamente 3,0 a 5,0 μm , e por uma pequena *Babesia*, *B. gibsoni*, que mede aproximadamente 1,5 a 2,5 μm (RISTIC, 1988). *Babesia canis* pode apresentar formas piriformes, redondas, ovais, alongadas ou amebóides. As hemácias geralmente são parasitadas por dois merozoítos, mas podem ser encontrados quatro, oito ou mais deles em uma mesma célula. Também é freqüente o encontro de formas livres no plasma, bem como de hemácias fagocitadas no interior de macrófagos (O' DWYER & MASSARD, 2002). *B. canis* tem ampla distribuição geográfica e foi descrita na Europa, África, Ásia, América do Norte e América do Sul (ANO et al., 2001a).

Já *B. gibsoni* possui forma redonda a oval, ocupando menos da metade do raio da hemácia. Geralmente aparecem como formas individuais no eritrócito, mas é possível também o encontro de numerosos parasitas numa mesma célula (KOCAN et al., 2001). Sua distribuição geográfica é mais restrita, sendo descrita na Ásia, América do Norte, África e Europa (ANO et al., 2001a). Nos dois relatos no Brasil, a identificação específica baseou-se apenas na morfologia observada em microscopia óptica (BRACCINI et al., 1992; LUCIDI et al., 2004).

Uilenberg et al. (1989) observaram que os isolados de grande *Babesia* de diferentes regiões geográficas apresentavam diferenças em relação a sua patogenicidade, podendo variar de uma doença fulminante com elevada parasitemia periférica, a uma doença transitória com poucos sinais clínicos e baixa parasitemia. Além disso, os diferentes isolados apresentavam diferentes vetores e diferenças antigênicas, apesar de sua semelhança morfológica. Desta forma, estes autores foram os primeiros a sugerirem a existência de três diferentes

subespécies de *B. canis*: *B. c. canis*, de patogenicidade moderada, transmitida por *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. c. vogeli*, considerada de baixa patogenicidade, transmitida por *R. sanguineus* em países tropicais e subtropicais; e *B. c. rossi*, altamente patogênica, transmitida por *Haemophysalis leachi* na África do Sul. Segundo Oyamada et al. (2005), essa subespécie também pode ter como vetor *R. sanguineus*, *Rhipicephalus evertsi evertsi* ou *Amblyomma lepidum*, já que em experimento realizado no Japão estes foram os únicos carrapatos recuperados dos 6,4% de cães que possuíam DNA de *B. c. rossi*, e *H. leachi* não foi encontrado parasitando nenhum desses animais.

A hipótese de Uilenberg et al. (1989) foi confirmada por vários pesquisadores (CITARD et al., 1995; HAUSCHILD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997). Zahler et al. (1998) conseguiram distinguir os três genogrupos, correspondentes às três subespécies propostas, utilizando a técnica de PCR e seqüenciamento. Embora os autores tivessem observado polimorfismo dentro da mesma subespécie de *B. c. canis* e de *B. c. vogeli* (0,1 e 2,1% respectivamente) de amostras de diferentes regiões do mundo, essa diferença foi muito pequena quando comparada ao polimorfismo observado entre as duas subespécies (18 a 31%). Em relação a *B. c. rossi*, a situação parece ser similar. Carret et al. (1999), usando enzimas de restrição, verificaram que as três subespécies podem ser facilmente diferenciadas geneticamente. Além disso, os três subgrupos de *B. canis* apresentam diferenças na especificidade pelo vetor, sorologia, patogenicidade e não possuem imunidade cruzada. Os autores verificaram também que *B. c. rossi* e *B. c. canis* apresentam uma similaridade, e que *B. c. vogeli* está filogeneticamente separada dessas duas subespécies. Portanto, embora tenham sido primeiro sugerido tratar-se de subespécies, evidências demonstram que são espécies verdadeiras, apesar das semelhanças morfológicas que existem entre elas.

Birkenheuer et al. (2004) relataram uma nova espécie de grande *Babesia* acometendo um cão que estava recebendo quimioterapia para linfoma, na Carolina do Norte, EUA. O animal nunca havia estado em outra região, nunca havia recebido transfusão sangüínea e tinha histórico de exposição a carrapatos. No esfregaço sangüíneo desse animal foram observados organismos semelhantes

a *B. canis*. Os autores realizaram a PCR e seqüenciamento e fizeram a comparação do organismo com as seqüências de várias espécies de *Babesia* e *Plasmodium falciparum* depositadas no GenBank e não encontraram nenhuma seqüência com 100% de similaridade. A análise genética demonstrou 93,9% de similaridade com *B. bigemina* e 93,5% com *B. caballi*, comparado com 91,2 a 91,6% de similaridade com *B. c. canis*, *B. c. vogeli* e *B. c. rossi*. A sorologia também foi realizada e não se detectou reação cruzada com outros agentes. Portanto, esse piroplasma foi considerado distinto geneticamente de todos os outros piroplasmas capazes de infectar os cães domésticos. Esta espécie vem sendo denominada *Babesia spp. sensu stricto*.

Nos últimos anos, a premissa de que todas as pequenas babesias diagnosticadas em cães eram *B. gibsoni* começou a ser questionada, já que pesquisas utilizando diagnóstico molecular e seqüenciamento genético demonstraram que esse pequeno piroplasma, isolado de diferentes regiões geográficas, diferiam geneticamente (BIRKENHEUER et al., 1999). Pesquisadores acreditam que existem pelo menos três diferentes subtipos de pequena *Babesia* acometendo cães (KJEMTRUP et al., 2000; ZAHLER et al., 2000b): *B. gibsoni* genotipo asiático, *B. gibsoni* genotipo californiano e um isolado de Oklahoma identificado em cães na América do Norte (ZAHLER et al., 2000b; ANO et al., 2001b; IRIZARRY-ROVIRA et al., 2001; KOCAN et al., 2001; BIRKENHEUER et al., 2003a). Os isolados californianos e de Oklahoma diferenciam-se não só geneticamente, mas também nos aspectos clínico-patológicos: o de Oklahoma é menos patogênico que o da Califórnia (MEINKOTH et al., 2002; BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Kjemtrup et al. (2006) realizaram a caracterização molecular do pequeno piroplasma isolado na Califórnia e encontraram diferenças moleculares, genéticas e antigênicas. Esse pequeno piroplasma possui características genéticas mais próximas dos piroplasmas isolados de seres humanos e de animais do leste dos Estados Unidos e foi denominado *B. conradae*. Os sinais clínicos da infecção por *B. conradae* são semelhantes aos da *B. gibsoni*, entretanto, *B. conradae* é mais

patogênica, resultando em alta parasitemia e anemia mais acentuada (KJEMTRUP & CONRAD, 2006).

Zahler et al. (2000a), na Alemanha, estudaram o caso de um cão que adquiriu um pequeno piroplasma na Espanha e apresentou sinais clínicos compatíveis com babesiose. Entretanto, a análise genética deste agente demonstrou maior similaridade com *T. microti* (96,7%, antes denominada *B. microti*), uma espécie de roedores, do que com *B. gibsoni* (89,5%) ou *B. canis* (88,6%). Assim, os autores consideraram as diferenças encontradas suficientes para separar o agente isolado em uma nova espécie, que por ser semelhante ao gênero *Theileria* foi denominada *Theileria annae*. Essa mesma espécie foi também identificada posteriormente por Camacho et al. (2001) no noroeste da Espanha.

Portanto, em relação aos pequenos piroplasmídeos diagnosticados em cães, são reconhecidos atualmente dois isolados de *B. gibsoni* (o asiático e o de Oklahoma), *B. conradae* (antiga *B. gibsoni* da Califórnia) e *T. annae*.

Além da provável diversidade de piroplasmas de cães, maior do que o estabelecido anteriormente, Criado-Fornelio et al. (2003b), em uma pesquisa realizada no sul da Europa, encontraram *Theileria equi* (= *Babesia equi*) infectando cães. Esse piroplasmídeo nunca havia sido descrito como um parasita de canídeos.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A transmissão de *Babesia* spp. ocorre por meio da picada de carrapatos ixodídeos, sendo estes os vetores biológicos. No Brasil, o principal vetor de *B. c. vogeli* é *R. sanguineus* (REGENDANZ & MUNIZ, 1936; PASSOS et al., 2005). Em relação a *B. gibsoni*, os vetores conhecidos são *Haemaphysallis bispinosa* e *H. longicornis* (SWAMINATH, 1937; OTSUKA, 1974) que ocorrem nos Estados Unidos e outros países, porém, há crescentes evidências de que *R. sanguineus* também seja um vetor potencial desse agente, cujo desenvolvimento tem sido demonstrado no intestino e glândulas salivares desse carrapato (HIGUCHI et al., 1995; HIGUCHI et al., 1999). Em *R. sanguineus* ocorre transmissão transovariana

de *B. canis*, pois a teleógina infectada transmite o parasito para sua prole. As larvas que nascem infectadas, ao mudarem para ninfas e depois adultos, permanecem infectadas, transmitindo o protozoário em todos os estágios. Essa forma de transmissão, conhecida como transmissão transestadial, é particularmente importante quando o vetor é um carrapato de três hospedeiros (O'DWYER & MASSARD, 2002). Esse protozoário pode também ser transmitido através de transfusão sanguínea (LOBETI, 1998).

Outras formas de transmissão têm sido relatadas por alguns pesquisadores. Birkenheuer et al. (2003b) sugeriram a hipótese de transmissão através de picada de pulgas, uso comum de agulhas e através da mordida de cão infectado. Miyama et al. (2005) realizaram estudo epidemiológico com 115 cães no Japão, e encontraram 35 (30,4%) cães positivos para *B. gibsoni* utilizando as técnicas de PCR e/ou ELISA. A frequência de cães positivos foi significativamente maior nos que haviam sido mordidos. Segundo esses autores, a principal via de transmissão de *B. gibsoni* em cães de luta pode ser através da mordida de um cão infectado. Fukumoto et al. (2005) demonstraram a transmissão congênita fatal de *B. gibsoni* usando fêmeas Beagle cronicamente infectadas. Dos 5 filhotes nascidos, houve um natimorto e os demais morreram entre 14 e 39 dias de idade. A PCR feita com sangue e órgãos (cérebro, coração, pulmão e fígado) dos quatro filhotes nascidos vivos e dos órgãos do natimorto, revelou serem todos positivos. Isso ressalta a importância de se detectar cães cronicamente infectados, já que a via transplacentária serve como via de infecção para os fetos. Esses mesmos autores provaram, também, que não ocorre transmissão de *B. gibsoni* pela via transmamária. No que se refere a *B. canis*, a possibilidade de transmissão vertical existe, já que a infecção tem sido documentada em filhotes com menos de dois dias de idade (FARWELL et al., 1982; TABOADA, 1998).

O período de incubação de *B. canis* é de 10 a 21 dias e de *B. gibsoni* varia de 7 a 21 dias (BOOZER & MACINTIRE, 2003). Existem alguns cães que são mais resistentes à infecção e não apresentam sinais clínicos. Os animais que permanecem como portadores assintomáticos conservam altos títulos de anticorpos por longo período de tempo, sendo dessa forma reservatórios do

agente. Os sinais clínicos de babesiose podem ocorrer se esses cães passarem por uma situação de estresse com queda da imunidade, como por exemplo, doenças concomitantes (BRANDÃO et al., 2003).

Animais jovens são mais susceptíveis à infecção que os animais adultos. Em cães com idade entre 3 e 6 meses a frequência de anticorpos é menor e constituem o grupo de maior risco de adquirir a infecção por *B. canis* (RIBEIRO et al., 1990). Cães com idade inferior a 3 meses são protegidos por anticorpos de origem materna (FARWELL et al., 1982).

Não há predileção quanto ao sexo, mas em relação à raça, foi descrito que nos EUA *B. gibsoni* afeta quase que exclusivamente cães da raça Pit Bull e American Staffordshire Terriers. Fatores genéticos, condições ambientais e a transmissão vertical podem estar envolvidos (BOOZER & MACINTIRE, 2003). A doença tem sido registrada apenas esporadicamente em outras raças (BOOZER & MACINTIRE, 2003; BIRKENHEUER et al., 2003b). Em Aomori, no Japão, todos os casos confirmados de *B. gibsoni* foram em cães Tosa, uma raça de luta (MIYAMA et al., 2005).

No Brasil, Passos et al. (2005) identificaram pela primeira vez *B. c. vogeli* em amostras oriundas do estado de Minas Gerais e do estado de São Paulo. A análise da seqüência do DNA demonstrou 100% de similaridade entre os isolados brasileiros. No Rio de Janeiro, Sá et al. (2006) também encontraram pela PCR *B. c. vogeli* como sendo a única subespécie acometendo os 45 cães positivos para *B. canis*. Estudos recentes em Botucatu (SP) corroboram os resultados anteriores, onde amostras de cães naturalmente infectados foram seqüenciadas, demonstrando similaridade próxima a 100% com *B. c. vogeli* (DINIZ, 2005¹).

As frequências de *Babesia* spp. em cães registradas no Brasil revelam diferenças em relação a amostra populacional, região do país selecionada, da procedência urbana ou rural e à técnica de diagnóstico utilizada (Quadro 1).

QUADRO 1. Frequência de *Babesia* spp. em cães no Brasil, de acordo com a localidade e a técnica de diagnóstico.

Frequência (%)	Local	Técnica	Número de Animais	Autores (ano)
14,0	Rio de Janeiro	Esfregaço sangüíneo e "imprint" de órgãos	100	Paraense et al. (1949)
66,9	Minas Gerais	IFI	127	Ribeiro et al. (1990)
42,4	São Paulo	IFI	106	Dell-Porto et al. (1993)
10,3	São Paulo	Esfregaço sangüíneo	106	Dell-Porto et al. (1993)
5,2	Rio de Janeiro	Esfregaço sangüíneo	250	O'Dwyer et al. (2001)
36,0	Paraná	IFI	383	Trapp et al. (2002)
31,0	Minas Gerais	-	194	Bastos et al. (2004)
55,7	Botucatu-SP	IFI	-	Diniz et al. (2004)
67,7	Jaboticabal -SP	IFI	260	Furuta (2004)
94,61	Jaboticabal -SP	ELISA	260	Furuta (2004)

2.4 CICLO

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre pela inoculação dos esporozoítas juntamente com a saliva dos carrapatos, durante o repasto sangüíneo. Para *B. canis*, o carrapato deve alimentar-se durante 2 a 3 dias para que ocorra a transmissão (MARTINOD et al., 1985). Os esporozoítas penetram nas hemácias, arredondam-se e transformam-se em trofozoítas. Esses dividem-se assexuadamente no interior das hemácias que, ao romperem, liberam os merozoítas que penetram em outras hemácias ocasionando anemia, febre e hemoglobinúria. Esse processo de divisão continua até que o organismo controle a infecção ou ocorra a morte do hospedeiro (SHORTT, 1973).

O hospedeiro invertebrado, representado pelos carrapatos, infecta-se ingerindo hemácias parasitadas durante o repasto sangüíneo. No intestino do carrapato ocorre reprodução sexuada dando origem a um zigoto, que por um processo de divisão assexuada, denominada esporogonia, dá origem a numerosos esporocinetos. Estes migram para diversos órgãos do carrapato, inclusive ovários e glândula salivar. Somente quando atingem a glândula salivar é que estes esporocinetos dão origem aos esporozoítas infectantes (SHORTT, 1936).

2.5 PATOGENIA

A patogenicidade depende da espécie ou subespécie de *Babesia* com qual o animal se infectou e é mais complexa do que inicialmente reconhecida. Muitos mecanismos patogênicos estão relacionados mais com a resposta imune do hospedeiro contra o agente do que resultante de uma destruição direta dos eritrócitos pelo parasito (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Tanto fatores imunes humorais como celulares estão envolvidos na proteção contra *Babesia*, sendo o baço um órgão linfóide que tem papel fundamental na resposta contra o agente. A esplenomegalia, observada na maioria dos cães com babesiose, pode ser resultado do aumento da atividade

fagocítica ou da dilatação e congestão da sua microvasculatura. Ele possui populações de linfócitos T e B, células “natural killers” e macrófagos, exercendo uma função muito importante na resposta imune celular contra *B. canis*, principalmente mediada pelas células CD4⁺, uma subpopulação das células T. O sistema mononuclear do baço é responsável pela fagocitose, formação de anticorpos e mediadores solúveis, como Interferon gama, e tem uma ação bem conhecida na resolução do padrão de crescimento do parasita, e dessa maneira, na extensão da parasitemia. Durante o primeiro estágio de infecção, quando os esporozoítos estão livres no plasma por um curto período de tempo, as IgG podem prevenir a infecção ligando-se aos parasitas e, dessa forma, promovendo sua neutralização antes que eles invadam sua célula alvo (BRANDÃO et al., 2003).

Portanto, a infecção é mais grave em cães esplenectomizados, nas quais a parasitemia é maior e a hemoglobinemia é mais freqüente do que nos cães não esplenectomizados (ITOH et al., 1998).

2.6 SINAIS CLÍNICOS

As características clínicas da babesiose canina dependem da espécie ou subespécie de *Babesia*, resposta imune e idade do hospedeiro, presença de infecções concomitantes e da exposição prévia ao agente (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Babesia canis é capaz de causar uma ampla variedade de sinais clínicos que podem envolver infecção subclínica, anemia, trombocitopenia, letargia, anorexia, hemoglobinúria, bilirrubinúria, febre, icterícia e esplenomegalia. Casos severos podem ser acompanhados de insuficiência renal aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo (ocasionado por um edema pulmonar agudo), acidose, coagulação intravascular disseminada, hemoconcentração, hepatopatia e uma síndrome neurológica referida como babesiose cerebral. Esta ocorre quando proteínas de superfície derivadas do parasita ligam-se aos receptores das células endoteliais cerebrais ocasionando uma resposta inflamatória local. Os sinais clínicos manifestam-se por tremores musculares, paresia dos membros

posteriores, nistágmo, anisocoria, agressividade, vocalização e estado alterado de consciência (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Brandão et al. (2003), em uma pesquisa realizada no Brasil com cães infectados experimentalmente por *B. canis*, encontraram a esplenomegalia como o sinal clínico mais comum, presente em todos os animais infectados, seguido de febre e trombocitopenia.

Babesia c. rossi é altamente patogênica e causa uma doença hemolítica (possivelmente imunomediada) com uma resposta inflamatória grave e aguda (SCHETTERS et al., 1997). Rabdomiólise foi descrita por Jacobson et al. (1996) como uma complicação causada por essa subespécie em dois cães. Por outro lado, a infecção com *B. c. canis* resulta numa parasitemia transitória, geralmente abaixo de 1%, e a doença clínica está associada com a congestão dos órgãos internos. A infecção por *B. c. vogeli* leva a uma doença relativamente leve, e, freqüentemente, sem evidências de sinais clínicos (SCHETTERS et al., 1997). Dessa maneira, os anticorpos produzidos possuem uma limitada ou nenhuma eficácia entre as subespécies de *B. canis*. Possivelmente, a heterogeneidade genética existente entre elas seja a responsável pela falta de proteção contra um desafio heterólogo. Esse conhecimento se torna de grande importância na pesquisa de uma vacina contra *Babesia* (CARRET et al., 1999).

Animais positivos que têm anticorpos contra *B. canis* geralmente não apresentam sinais clínicos da doença por um período superior a um ano. Isso pode ser resultado de uma imunidade protetora efetiva. Por outro lado, cães que estão clinicamente infectados e imunossuprimidos, ou aqueles que receberam tratamento que eliminam a *Babesia* e não possuem uma imunidade protetora efetiva, podem apresentar sinais de recorrência da doença 5 a 8 meses após a infecção precedente (TABOADA, 1998, BRANDÃO et al., 2003). Brandão et al. (2003) verificaram em um experimento realizado utilizando a técnica de IFI, que títulos de anticorpos menores que 180 falham em proteger o animal contra uma reinfeção por uma linhagem homóloga, enquanto que títulos maiores ou iguais a 320 são suficientes para evitar a reinfeção.

A persistência de uma infecção residual pode promover uma estimulação antigênica, e assim, um longo período de imunidade contra a *Babesia*. Isso é particularmente importante em regiões endêmicas (BRANDÃO et al., 2003).

Os sinais clínicos da infecção por *B. gibsoni* são muito similares aos de *B. canis* e incluem febre, trombocitopenia, anemia regenerativa, esplenomegalia, linfadenopatia e letargia. A icterícia clínica é incomum (MEINKOTH et al., 2002).

Fukumoto et al. (2003) verificaram que cães infectados com *B. gibsoni*, às vezes, apresentam uma anemia progressiva, porém com baixa parasitemia no sangue periférico, e produção de anticorpos contra as hemácias que podem ser detectados pelo teste de Coomb's, técnica recomendada para diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada.

2.7 DIAGNÓSTICO

Um diagnóstico rápido e acurado é difícil, pois os sinais não são específicos (LOBETI, 1998). Recentes alterações relativas a distribuição geográfica de vários piroplasmas caninos também têm tornado complicado o diagnóstico de *Babesia* em cães (BIRKENHEUER et al., 2003a). Entretanto, uma correta identificação do agente infeccioso é importante já que a virulência, prognóstico e resposta à terapia são variáveis (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Vários métodos diagnósticos têm sido usados para detectar a presença de infecção por *Babesia* spp. com diferentes níveis de sucesso. O exame microscópico de esfregaços sangüíneos é o método clássico de diagnóstico (PARAENSE & VIANNA, 1949; EWING, 1965), entretanto, é um método limitado porque tem baixa sensibilidade, não detectando casos crônicos e atípicos (UILENBERG et al., 1989). Além disso, não fornece informações necessárias para estabelecer o genótipo de qualquer piroplasma (BIRKENHEUER et al., 2003a), pois é difícil distinguir morfologicamente espécies ou subespécies similares (KRAUSE et al., 1996). No exame por esfregaço sangüíneo, a utilização de sangue capilar, obtido da ponta da orelha ou dos coxins plantares ou palmares, aumenta a possibilidade de evidenciar hemácias parasitadas quando comparado

ao esfregaço do sangue da jugular. Isto ocorre em virtude da diminuição da plasticidade da hemácia (ocasionada pela peroxidação lipídica da membrana eritrocitária pelo parasita) e do conseqüente acúmulo de hemácias parasitadas em vasos de menor calibre como capilares e vênulas (TABOADA et al., 1991).

Os métodos sorológicos, como o teste de ELISA (BOBADE & ODUE, 1986) e o teste de IFI, o mais freqüentemente realizado (ANDERSON et al., 1980; YAMANE et al., 1994), são utilizados para a pesquisa de anticorpos anti-*Babesia*. Porém, os níveis de anticorpos persistem por 3 a 5 meses mesmo após a eliminação do parasita devido a resposta humoral residual (TABOADA et al., 1991; BOOZER & MACINTIRE, 2003). Além disso, em áreas endêmicas sua aplicação é limitada pela possibilidade de ocorrer resultados falso-negativos nos estágios iniciais da infecção (BICALHO et al., 2004). O teste de IFI apresenta baixa especificidade, além de falhar em identificar infecção recente (YAMANE et al., 1994, BIRKENHEUER et al., 2003a). Nos testes sorológicos, os anticorpos anti-*Babesia* freqüentemente produzem reação cruzada, não permitindo discriminar definitivamente espécies e subespécies (BIRKENHEUER et al., 2003a) e nem detectar a presença de infecções concomitantes por duas ou mais espécies e/ou subespécies (CARRET et al., 1999).

O diagnóstico molecular de *Babesia* spp. tem demonstrado que a especificidade dos piroplasmídeos pelos hospedeiros é menor do que se supunha anteriormente e somente o uso de técnicas sensíveis de diagnóstico pode caracterizar com precisão as espécies. A utilização da PCR tem permitido aos pesquisadores identificar novas espécies (ZAHLER et al., 2000b), novas áreas endêmicas para antigas espécies (JEFFERIES et al., 2003) e inclusive, espécies em hospedeiros não usuais, como por exemplo, *T. equi* em cães (CRIADO-FORNELIO et al., 2003a, b).

Diante do exposto, técnicas moleculares, como a PCR, estão sendo utilizadas para detectar e identificar efetivamente as espécies de *Babesia*. A análise de seqüências de DNA pode proporcionar informações taxonômicas, quando características morfológicas de diferentes parasitas são idênticas (JEFFERIES et al., 2003). A PCR é mais sensível que o exame microscópico e

mais específica que a sorologia (BIRKENHEUER et al., 2003a). O uso desse método molecular permite realizar facilmente o diagnóstico da infecção por *Babesia* determinando a subespécie (OYAMADA et al., 2005). Macintire et al. (2002) relataram a detecção de 18 amostras de sangue positivas para *Babesia* na PCR contra 10 (n=33) detectadas pela microscopia óptica. Inokuma et al. (2004), avaliando 80 cães de rua na ilha de Okinawa (Japão), diagnosticaram 12 animais PCR positivos para *Babesia*, dos quais sete apresentaram formas parasitárias compatíveis nos esfregaços sangüíneos. Portanto, apenas o uso de métodos moleculares pode levar a uma correta identificação desses parasitas (CRIADO-FORNELIO et al., 2003b).

Miyama et al. (2005) associaram a técnica da PCR e ELISA em uma pesquisa epidemiológica sobre *B. gibsoni* realizada em cães no Japão. Verificaram que a vantagem dessa combinação sobre outras técnicas é sua maior sensibilidade para o diagnóstico desse hemoparasita. Com isso foi possível distinguir infecções recentes (presença do parasita com ausência de anticorpos), infecções estabelecidas (presença do parasita e de anticorpos) daquelas onde o animal já havia se recuperado (presença de anticorpo e ausência do parasita). Dos 115 cães testados, 27 (23,5%) foram soropositivos pelo ELISA e 29 (25,2%) foram positivos pela PCR. Dos 29 positivos pela PCR, 21 também foram positivos pelo ELISA (infecção estabelecida). Entretanto, oito dos 29 cães positivos pela PCR foram negativos pelo ELISA (infecção recente). Seis cães foram negativos pela PCR e positivos pelo ELISA (animal recuperado). Trinta e cinco dos 115 cães (30,4%) foram positivos pela PCR e/ou ELISA.

2.7.1 Diagnóstico molecular de *Babesia* spp. de cães

Carret et al. (1999) realizaram a diferenciação das subespécies de *B. canis* através da PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism"). Os oligonucleotídeos utilizados amplificam aproximadamente 400 pb da maioria das espécies de *Babesia*. A análise filogenética das subespécies de *B. canis* e de outras espécies de *Babesia* foi realizada através da comparação das seqüências

dos produtos da PCR de *B. c. canis*, *B. c. rossi* e *B. c. vogeli* com *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. divergens*, *T. equi*, *T. microti*, *B. odocoilei* e *B. rodhaini*. Utilizando as enzimas de restrição *Hinf* I e *Taq* I obtiveram um único padrão de restrição para cada subespécie de *B. canis*. *Babesia c. vogeli* sofreu digestão apenas pela enzima *Taq* I, separando-a em 3 fragmentos de DNA, enquanto não houve digestão de *B. c. rossi* e *B. c. canis*. A enzima *Hinf* I separou *B. c. rossi* em dois fragmentos, porém, não houve digestão de *B. c. canis* e *B. c. vogeli*. Já *B. c. canis* não sofreu digestão por nenhuma das enzimas utilizadas.

Zahler et al. (2000a) analisaram o DNA de uma pequena *Babesia* de cão, originada da Espanha, utilizando os oligonucleotídeos RIB-19 e RIB-20. O primeiro oligonucleotídeo foi modificado do oligonucleotídeo A universal e amplifica uma porção próxima ao final 5' de 18S rDNA que é conservado em eucariontes. O segundo oligonucleotídeo, localizado na porção final 5' de 18S rDNA, foi construído para se ligar a uma região conservada em *B. canis*, *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. odocoilei*, *B. divergens*, *T. microti*, *B. rodhaini*, *B. bovis*, *T. equi*, *T. parva*, *T. sergenti* e *T. buffeli*. A seqüência amplificada possuía comprimento de 1712 pb e quando foi comparada com as seqüências de outras espécies de *Babesia*, demonstrou identidade de 89,5% com *B. gibsoni*, 88,6% com *B. canis*, 96,7% com *T. microti*, 90,4% com a pequena *Babesia* isolada dos EUA. Diante dos resultados obtidos, os autores sugeriram a criação de uma nova espécie, denominada *T. annae*.

Kocan et al. (2001) caracterizaram uma pequena *Babesia* isolada de um cão de Oklahoma utilizando oligonucleotídeos que amplificam o gene 18S rRNA de membros da Ordem Piroplasmorida: BH 1-NSSRNA e ER 1-NSSRNA-3-2. O DNA foi seqüenciado e alinhado com os genes 18S rRNA de *B. gibsoni* da Califórnia (hoje denominada *B. conradae*) e *B. canis* da África do Sul. Essa amostra apresentou diferenças consistentes com os isolados com os quais foi comparado, e portanto, os autores concluíram que existem pelo menos duas pequenas babesias diferentes em cães nos EUA.

Ano et al. (2001a) examinaram o sangue de 10 cães naturalmente infectados com *Babesia* spp. e de 3 cães experimentalmente infectados com *B.*

gibsoni. Os oligonucleotídeos utilizados amplificam uma seqüência de aproximadamente 500 nucleotídeos de *B. gibsoni*. Como o produto da primeira PCR não foi visualizado como banda, foi realizado um “nested-PCR”, utilizando oligonucleotídeos internos cujos produtos possuem 327 pb. Todas as amostras examinadas produziram bandas com 327 pb, confirmando que as amostras eram realmente de *B. gibsoni*. O teste apresentou alta sensibilidade e especificidade e segundo os autores é útil para detectar animais portadores.

Ano et al. (2001b), utilizando os mesmos oligonucleotídeos do trabalho anterior (ANO et al., 2001a), analisaram o sangue de 7 cães naturalmente infectados com *B. gibsoni* e compararam estas amostras com os isolados da Europa, EUA, Ásia 1 e Ásia 2. Todas as seqüências obtidas em Miyazaki foram idênticas entre si e dos isolados Ásia 1 e 2, e apresentaram similaridade de 84% com as amostras dos EUA e da Europa.

Fukumoto et al. (2001) desenvolveram oligonucleotídeos específicos para *B. gibsoni* (Oligonucleotídeo d3 e Oligonucleotídeo d4), que mostraram-se altamente específicos — não detectaram DNA de *B. canis* — e sensíveis, detectando DNA em parasitemias de 0,000002%.

Cacciò et al. (2002) utilizaram métodos moleculares para caracterizar *B. canis* de cães naturalmente infectados provenientes da Croácia, Itália, França e Polônia. Foram utilizados oligonucleotídeos universais para o subfilo Apicomplexa. A amplificação produziu produtos simples com aproximadamente 1700 pb. A análise dos produtos de PCR revelou a presença de duas seqüências diferentes, porém, intimamente relacionadas. A primeira seqüência, de comprimento de 1714 pb foi encontrada nos cães da Croácia e em dois cães da Itália, sendo que um deles havia adquirido a infecção na Polônia. Estes isolados foram bastante similares (99,5%) a uma seqüência de *B. c. canis*. A segunda seqüência, de 1713 pb estava associada à infecção do cão da França e apresentou similaridade (98,6%) com *B. c. vogeli*.

Segundo esses mesmos autores (CACCIÒ et al., 2002), os resultados obtidos indicaram que as três subespécies de *B. canis* formam um grupo monofilético irmão do grupo de *B. odocoilei* e *B. gibsoni*, sendo *B. c. vogeli*

estritamente relacionada a *B. c. canis*. A discrepância encontrada em relação à análise das seqüências parciais do gene rRNA feita por Carret et al. (1999), na qual a posição de *B. c. vogeli* permaneceu incerta, evidenciou a limitação da análise filogenética baseada em seqüências parciais do gene. De acordo com os autores, a presença de *B. c. canis* e *B. c. vogeli* e a ausência de *B. c. rossi* em cães da Europa está de acordo com a distribuição dos vetores. Entretanto, os pesquisadores argumentaram que essa situação pode mudar em virtude da crescente mobilidade internacional dos cães, podendo levar à expansão da infecção para outras áreas. Além disso, o contato de cães com o ambiente silvestre pode expô-los à infecção com outras espécies de *Babesia*. Desta forma, os cães podem tornar-se possíveis reservatórios de zoonoses e deveriam ser monitorados para a presença de *Babesia* spp.

Jefferies et al. (2003) utilizaram a técnica de PCR e seqüenciamento para detectar e caracterizar *Babesia* spp. de cães na Austrália. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 450 pb do gene 18S rRNA foram: Piro A1 e Piro B. O primeiro reconhece o DNA da maioria das espécies de *Babesia* e o segundo oligonucleotídeo foi usado por Carret et al. (1999) para diferenciar as três subespécies de *B. canis*. Produtos de 450 pb foram amplificados em 14 amostras de sangue de 34 cães do nordeste da Austrália e o seqüenciamento parcial dos genes demonstrou similaridade com o isolado de *B. c. vogeli* do Egito. A seqüência de DNA de três isolados de *Babesia* de cães de Victoria, naturalmente infectados com uma pequena *Babesia*, mostraram alinhamento idêntico à *B. gibsoni*. Na Austrália, até recentemente, acreditava-se que *B. canis* era a única espécie enzoótica em cães. Os autores encontraram 99% de similaridade com os isolados de *B. c. vogeli* do Egito e sugeriram que podem haver diferentes genótipos dentro de uma mesma subespécie de *Babesia*.

Criado-Fornelio et al. (2003a, b) demonstraram que o uso da PCR como instrumento de diagnóstico pode revelar infecções por piroplasmídeos em hospedeiros não usuais, como o encontro de *T. annae* e *B. c. canis*, parasitas de cães, em felinos. Assim, os pesquisadores examinaram o sangue de 10 cães com sintomatologia compatível com babesiose e encontraram cinco animais infectados,

sendo três com *B. c. canis*, com características idênticas aos isolados da Croácia, um com *B. c. vogeli*, com 99% de similaridade com o isolado da França, e um com *T. equi* com 99% de similaridade. Posteriormente, mais 12 cães foram testados e três também estavam positivos para *T. equi*. Os cães positivos para *T. equi* eram provenientes de área rural e a maioria deles era assintomático. Os autores descartaram a hipótese de contaminação da amostra e discutiram que *T. equi* é muito semelhante morfológicamente a *B. gibsoni* e provavelmente este é o motivo da confusão de diagnóstico.

A análise filogenética de *Babesia* de cães na Espanha demonstrou que estas são geneticamente similares, apesar de não serem idênticas, a outros isolados. As pequenas variações encontradas devem representar variações de cepas, sem significado taxonômico (CRIADO-FORNELIO et al., 2003c).

2.8 RESPOSTA À TERAPIA

O tratamento dos cães com babesiose está direcionado para o controle do parasito, moderação da resposta imune e tratamento sintomático. Porém, cada espécie ou subespécie apresenta uma determinada resposta em relação ao tratamento. *Babesia c. vogeli* e *B. c. canis* respondem bem às drogas anti-*Babesia*. Já *B. c. rossi* pode não ser susceptível a terapia usada rotineiramente. A *B. gibsoni* genotipo asiático é considerada virulenta em cães e nenhum tratamento anti-*Babesia* é capaz de eliminar a infecção. *Babesia conradae* também é virulenta e sua susceptibilidade à terapia anti-*Babesia* ainda não foi bem caracterizada. E em relação a *T. annae*, sua patogenicidade ou resposta ao tratamento ainda não foi estudada. (BIRKENHEUER et al, 2003a).

Porém, Brandão et al. (2003), no Brasil, verificaram que o tratamento com dipropionato de imidocarb (Imizol®) foi muito efetivo para eliminar o parasita mas não permitiu a manutenção dos anticorpos protetores, fazendo com que os animais tratados fossem mais susceptíveis à reinfecção. Esse medicamento é capaz de debelar completamente a infecção por *B. canis* num período de 24 horas após a administração, interrompendo dessa forma o estímulo antigênico

necessário para a produção dos anticorpos. Assim, o título de anticorpos dos cães tratados não é capaz de evitar a reinfecção.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é estudar a epidemiologia e a ocorrência de espécies de *Babesia* em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo, utilizando as técnicas de esfregaço sangüíneo e PCR, e identificar as espécies de carrapatos encontradas nestes cães.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Para a realização deste estudo foram coletadas amostras de sangue de cento e cinquenta cães de áreas rurais do Estado de São Paulo durante o período de novembro/2004 a janeiro/2005 (Figura 1). Os animais foram escolhidos aleatoriamente, independente da raça ou estado de saúde e após a autorização do proprietário, totalizando 86 machos e 64 fêmeas, sendo 32 deles com idade inferior a um ano e 118 com idade superior a um ano. Destas amostras, 50 foram provenientes de Botucatu, 50 de Rio Claro e 50 de Presidente Prudente. Cada animal foi examinado para verificar a presença de carrapatos.



FIGURA 1. Exemplo de residência visitada para exame de cães de áreas rurais do estado de São Paulo.

4.2 Colheita de sangue

O sangue, coletado da veia jugular em tubos “vacutainer” contendo EDTA 10%, foi usado para a confecção de esfregaço sangüíneo e extração do DNA. Amostras de sangue periférico, provenientes de vasos auriculares (ponta de

orelha), obtidas com o auxílio de uma lanceta, também foram usadas para a confecção de esfregaços sangüíneos.

4.3 Colheita e Identificação dos Carrapatos

Todos os cães foram examinados, especialmente nas orelhas e coxins plantares e palmares, para detecção da presença de carrapatos. Caso encontrados, os exemplares eram coletados e armazenados em frascos para posterior identificação. Os adultos coletados foram classificados segundo chave de Aragão & Fonseca (1961).

4.4 Local da realização do experimento

O experimento foi realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu-SP.

4.5 Acondicionamento das amostras

Todas as amostras de sangue foram identificadas e transportadas sob refrigeração (4°C) até o Departamento e em seguida armazenadas em freezer à -20°C até o momento da realização da extração do DNA.

4.6 Processamento das amostras

Os esfregaços sangüíneos foram fixados durante 5 minutos em metanol e corados com Giemsa 10% por 30 minutos. A observação sistemática desses esfregaços, feita aproximadamente em 100 campos (SOARES et al., 2006), foi realizada em microscopia óptica, objetiva de 100x, procurando-se merozoítos de *Babesia* spp. no interior das hemácias ou livres no plasma. A parasitemia foi calculada em um total de mil hemácias.

4.7 Extração do DNA genômico

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o Kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Os procedimentos adotados foram os seguintes:

- Colocar 300 µl de sangue e 900 µl de solução de lise (KHCO_3 10mM; NH_4Cl 155mM; EDTA 0,1mM) em microtubo de 1,5 ml;
- Homogeneizar e centrifugar a 20.800 g por cinco minutos e descartar o sobrenadante;
- Homogeneizar e acrescentar 500 µl da solução de extração;
- Incubar por cinco minutos em temperatura ambiente e transferir o conteúdo do tubo para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor;
- Centrifugar a 5.000 g por 1 minuto e descartar o sobrenadante;
- Adicionar à coluna 500 µl da solução de extração e centrifugar a 5.000 g por 1 minuto;
- Adicionar à coluna 500 µl da solução de lavagem (Tampão Tris-EDTA) e centrifugar a 20.800 g por 3 minutos;
- Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 ml, limpo e livre de DNAses;
- Adicionar 100 µl de água bidestilada, autoclavada e aquecida à 70°C;
- Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 5.000 g por 1 minuto;
- Identificar as amostras e acondicionar em freezer à -20°C para posterior utilização.

4.8 Obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para a realização da PCR. As seqüências basearam-se na literatura (JEFFERIES et al., 2003) e amplificam uma região de aproximadamente 450 pb do gene 18S rRNA: Piro A1 *forward* (5'-AGG GAG CCT GAG AGA CGG CTA CC - 3') com 23 bases e Piro B *reverse* (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3') com 21 bases. Segundo esses mesmos autores, a técnica de PCR para *Babesia* utilizando estes oligonucleotídeos foi específica e altamente sensível, detectando DNA em parasitemia de aproximadamente 0,0000027%.

Os oligonucleotídeos (Invitrogen) foram adquiridos e diluídos a 100 pmol/ μ l com água Milli Q autoclavada. Esta solução mãe foi diluída também em água Milli Q autoclavada, em quantidade suficiente para obter a solução de uso, cuja concentração final é de 10 pmol/ μ l.

4.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

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

Para verificação de contaminação durante o processo foi utilizado em todas as reações um controle negativo através da substituição do DNA da amostra por H₂O Milli Q autoclavada. O controle positivo consistiu de uma amostra de DNA genômico obtido de um cão naturalmente infectado por *Babesia* spp. A presença

de merozoítos intraeritrocíticos de *Babesia* foi feita pela visualização em esfregaço sangüíneo.

4.10 Eletroforese em gel de agarose

A eficiência das amplificações foi monitorada utilizando um método padrão segundo Sambrook et al. (1989). O produto amplificado (8 μ l) adicionados de 2 μ l de tampão de corrida foi submetido à eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL) 2% em solução de TAE 1x (Tris-base 0,4 M; ácido acético 0,2 M e solução de EDTA 0,5 M, pH 8.0) contendo brometo de etídio a 0,5 μ g/ml. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal Hoeker HE 33[®] (Amersham Pharmacia Biotech) a 80 volts por 1 hora e 30 minutos. A banda foi visualizada em um transluminador UV (Amersham Pharmacia Biotech) e fotografada com câmara digital *Nikon coolpix 750*. Para determinação dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (100bp DNA Ladder, Amersahm Biosciences). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 450 pb.

4.11 Purificação dos produtos da PCR

Para a obtenção da banda específica para o seqüenciamento direto, o produto de PCR de 450 pb foi extraído e purificado utilizando o Kit Montage[™] PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore[®]). Os procedimentos adotados foram os seguintes:

- Completar o volume da reação de PCR para um volume final de 400 μ l e transferir para a coluna de purificação;
- Centrifugar por 1.000 x g por 15 minutos;
- Adicionar 20 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) estéril à coluna de purificação, inverter e centrifugar a 1.200 x g por 2 minutos;

- Identificar as amostras e acondicionar em freezer -20°C para posterior utilização.

4.12 Reação de seqüenciamento

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 6 µl de 2,5x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 2 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 µmol dos oligonucleotídeos forward e reverse, e 4 µl do DNA genômico a 5 ng/µl. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C/segundo, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas á 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o oligonucleotídeo forward e outra para o reverse.

4.13 Precipitação

Para cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80 µl de isopropanol 65%, e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 10.000 rpm por 25 minutos, a temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, adicionou-se 200 µl de etanol 70% e centrifugou-se a velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas a temperatura ambiente e o DNA foi eluído em 2 µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems,

USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

4.14 Análise das seqüências

As seqüências forward e reverse, geradas automaticamente, foram alinhadas com auxílio dos programas MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e CLUSTAL W versão 1.8 (THOMPSON et al., 1994). A seguir foram comparadas com outras disponíveis no GenBank, e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Posteriormente as seqüências foram utilizadas para construção das árvores filogenéticas utilizando-se o programa MEGA versão 2.1 (KUMAR et al., 2001). Taxas de divergência foram conduzidas, utilizando-se os métodos de máxima parsimônia (MP) e distância (NJ) na reconstrução filogenética do fragmento estudado. Para se estimar o índice de consistência das análises de distância foram utilizadas árvores com teste de bootstrap sobre 1000 réplicas (FELSEINSTEIN, 1985).

4.15 Análise Estatística

Os dados obtidos pela técnica de PCR e aqueles obtidos pelo exame dos esfregaços sangüíneos foram comparados utilizando-se o Teste do χ^2 , pelo Programa Epiinfo 6 (Dean et al., 1995), adotando-se o nível de significância de 5%. Para o estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado o teste de Goodman (1965), para contrastes entre e dentro das proporções multinomiais.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Esfregaço sangüíneo

Nos esfregaços sangüíneos de sangue capilar de 150 amostras foram detectados três (2%) cães positivos, ou seja, que apresentavam merozoítos de *Babesia* no interior das hemácias (Figura 2). Destes, dois (1,33%) foram provenientes de Botucatu e um (0,66%) de Presidente Prudente. Em Rio Claro não foram encontrados animais com parasitemia detectável no esfregaço. A parasitemia calculada foi de 0,03 a 0,1%. Nos esfregaços realizados com sangue de jugular não foram observados merozoítos de *Babesia* em nenhum animal.

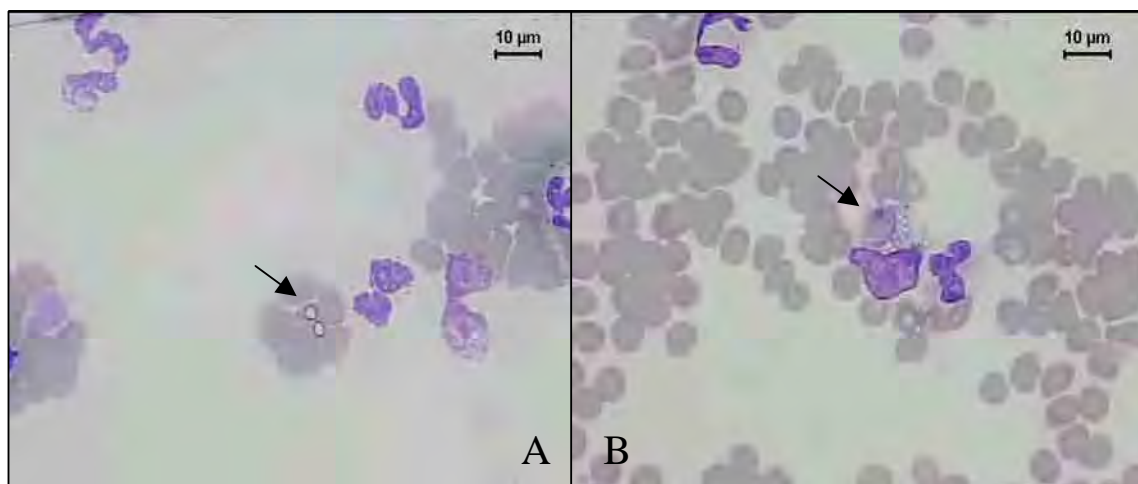


FIGURA 2. A. Merozoítos de *Babesia canis vogeli* (seta) observados em lâmina de esfregaço sangüíneo do sangue capilar de um cão (1.000X). B. Eritrofagocitose de uma hemácia parasitada por *B. c. vogeli* (seta) observada em esfregaço sangüíneo (1.000X).

5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das 150 amostras analisadas, 12 (8%) foram positivas pela PCR para *Babesia* spp., com bandas visualizadas em 450 pb. Destas, quatro (2,66%) foram de Botucatu, seis (4%) de Rio Claro e duas (1,33%) de Presidente Prudente, não havendo diferença estatística em relação ao número de animais parasitados nos

três municípios ($p > 0,05$). Desse total de cães infectados por *Babesia* spp., 10 eram machos e dois eram fêmeas, sendo oito deles com idade superior a um ano e quatro com idade inferior a um ano.

Os oligonucleotídeos PIRO A1 e PIRO B utilizados neste estudo para a realização da PCR foram designados como sendo específicos para o gênero *Babesia* (JEFFERIES et al., 2003). Entretanto, durante a execução do presente trabalho observou-se nos géis a amplificação de bandas de aproximadamente 500 pb, além das bandas de 450 pb (Figura 3), correspondentes aos produtos da amplificação do DNA de *Babesia*. O seqüenciamento de quatro das amostras que apresentaram a banda de 500 pb revelou 100% de identidade com *Hepatozoon canis*. Analisando as seqüências de ambos os parasitas, constata-se que o fragmento de DNA correspondente a *Hepatozoon* é aproximadamente 70 pb maior que o de *Babesia*.

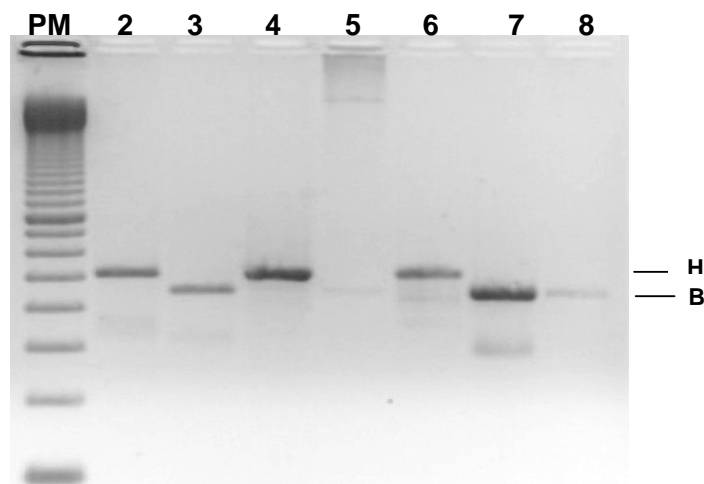


FIGURA 3. Resultado da PCR de sete amostras positivas. Observam-se fragmentos de 450 pb (linhas 3, 5, 7 e 8) correspondentes a amplificação do DNA de *Babesia* spp. (B) e fragmentos de 520 pb (linhas 2, 4 e 6) correspondentes a amplificação do DNA de *Hepatozoon* spp. (H). PM é padrão de 100 pb.

5.3 Carrapatos coletados

O parasitismo por carrapatos foi encontrado em 36 (24%) dos 150 cães. As espécies de *Amblyomma* encontradas foram *A. cajennense* (9/36 – 25,0%) e *A. ovale* (9/36 – 25,0%). Um espécime de *Amblyomma* (1/36 – 2,7%) não pôde ser identificado especificamente por se encontrar no estágio de ninfa. Assim, 19/150 cães (52,7%) foram encontrados infestados por carrapatos deste gênero. *Rhipicephalus sanguineus* também foi encontrado em 19/150 cães. A maioria dos cães estava infestado com apenas uma espécie de carrapato, exceto 2/150 deles (5,5%) que possuíam uma infestação mista por *R. sanguineus* e *A. cajennense*.

Dos animais que apresentavam carrapatos 17/150 (11,3%) eram de Botucatu, 13/150 (8,6%) de Rio Claro e 6/150 (4,0%) de Presidente Prudente. Em Botucatu foram encontrados 5/150 (3,3%) dos cães parasitados por *R. sanguineus* e 13/150 (8,6%) pelo gênero *Amblyomma*, sendo 7/150 (4,6%) pelo *A. cajennense* e 6/150 (4,0%) pelo *A. ovale*. Em Rio Claro, 10/150 (6,6%) dos cães estavam infestados pelo *R. sanguineus* e 4/150 (2,6%) pelo gênero *Amblyomma*, sendo metade pelo *A. cajennense* e metade pelo *A. ovale*. Em Presidente Prudente, *R. sanguineus* foi encontrado em 4/150 (2,6%) dos cães e o *Amblyomma* em 2/150 (1,3%), sendo igual o número de cães infestados pelo *A. ovale* e *Amblyomma* spp.

O número de cães infestados por *R. sanguineus* e *A. cajennense* no município de Botucatu foi superior ao de Presidente Prudente, sendo estatisticamente significativo, porém, não houve diferença quando comparado o número de cães de Rio Claro infestados por esses mesmos gêneros com os outros dois municípios. Por outro lado, há uma diferença estatística em relação a quantidade de cães com *R. sanguineus* daqueles com *A. cajennense* ou *A. ovale* no município de Rio Claro, sendo o número de cães infestados por *R. sanguineus* maior que o número de cães encontrados com infestação por *Amblyomma* spp. No município de Presidente Prudente não foram encontrados carrapatos *A. cajennense*, e apesar de somente um animal ter sido encontrado infestado com *A. ovale*, a diferença com o número de *R. sanguineus* detectados não foi significativa (Tabela 1).

TABELA 1. Distribuição dos carrapatos encontrados em 36 de 150 cães de áreas rurais do estado de São Paulo, de acordo com o município.

	Botucatu	Rio Claro	Pres. Prudente
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5 (29,4) ^{A a}	10 (76,9) ^{A a}	4 (80,0) ^{A a}
<i>Amblyomma cajennense</i>	7 (41,1) ^{A a}	2 (15,3) ^{B ab}	0 ^{B b}
<i>Amblyomma ovale</i>	6 (35,2) ^{A a}	2 (15,3) ^{B a}	1 (20,0) ^{AB a}
Total	18 (100)	14 (100)	5 (100)

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Teste de Goodman.

5.4 Comparação de dados

Comparando-se as técnicas de esfregaço sangüíneo e PCR (Tabela 2), a observação de merozoítos em lâmina detectou 25% (3/12) dos animais que foram positivos pela PCR, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ e $\chi^2 = 5,68$). Todos os animais positivos em lâmina foram positivos pela PCR.

TABELA 2. Porcentagem de animais positivos para *Babesia* diagnosticados pelas técnicas de esfregaço sangüíneo e de PCR em função do município de origem.

	Botucatu	Rio Claro	Pres. Prudente
Lâmina	1,33% (2/150)	0 (0/150)	0,66% (1/150)
PCR	2,66% (4/150)	4% (6/150)	1,33% (2/150)

$p < 0,05$ e $\chi^2 = 5,68$

Dos 12 cães que foram positivos para *Babesia* pela PCR e/ou esfregaço sangüíneo, cinco (3,3%) estavam infestados com carrapatos no momento da colheita do sangue. Todos eles estavam parasitados por *R. sanguineus* e em dois deles havia infestação mista com *A. cajennense*. O número de cães com *R. sanguineus* e negativos para *Babesia* foi superior ao número de cães com *R. sanguineus* e positivos para *Babesia*, sendo essa diferença estatisticamente

significativa. Não houve diferença estatística entre os cães com ou sem infestação por *R. sanguineus* e positivos para *Babesia* spp. (Tabela 3).

TABELA 3. Relação entre a ocorrência de *Babesia* spp. diagnosticada pela técnica de PCR e a presença de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães de áreas rurais de São Paulo.

Carrapatos	<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>	Total
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(positivos)	(negativos)	
Infestado	5 ^{A a}	14 ^{B b}	19
Não infestado	7 ^{A b}	124 ^{A a}	131
Total	12 (100%)	138 (100%)	150

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Teste de Goodman

5.5 Seqüenciamento das amostras

O seqüenciamento do DNA foi realizado em cinco das 12 amostras positivas para *Babesia* na PCR. Apenas uma amostra teve seu alinhamento “consense” (oligonucleotídeos foward e reverse) e a seqüência de nucleotídeos pôde ser comparada com outras seqüências disponíveis no GenBank. Foram utilizados no alinhamento 429 pares de bases (Figura 4). Não houve sucesso no seqüenciamento das outras quatro amostras, sendo que apenas um lado da fita de DNA foi seqüenciado (oligonucleotídeo foward). Assim, a análise filogenética dessas amostras não foi realizada, uma vez que para isso é necessária a obtenção da seqüência “consense”. Entretanto, a comparação do lado seqüenciado com as seqüências do GenBank permitiu verificar que essas quatro amostras são *B. c. vogeli*.

```

Hepatozoon_canis          CGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTAACAGTTTGAG
001                      CGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTAACAGTTTGAG
Babesia_canis_vogeli     CGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTGACA----CAG
010                      CGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTGACA----CAG
***** ** ** **

Hepatozoon_canis          AGAGGTAGTAACAAGAAATAACAATACAAGGCAATTAATGCTTTGTAATTGG-AATGA
001                      AGAGGCAGTAACAAGAAATAACAATACAAGGCAGTTAAATGCTTTGTAATTGGGAATGA
Babesia_canis_vogeli     GGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCT-----AATGCTTTGTAATTGG-AATGA
010                      GGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCT-----AATGCTTTGTAATTGG-AATGA
**** ** ***** ** **** *****

Hepatozoon_canis          TAGAAATTTAAACCTTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
001                      TAGAAATTTAAACCTTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
Babesia_canis_vogeli     TGGTGACCCAAACCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
010                      TGGTGACCCAAACCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
* * * ***** * **** *****

Hepatozoon_canis          GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
001                      GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
Babesia_canis_vogeli     GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
010                      GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
*****

Hepatozoon_canis          AGTTC----TGCTAAAAGTAACCG---GTCTGCTTTTAATAAAAAG-----TGGTATCTT
001                      AGTTC----TGCTGAAAGTAACCG---GTCTGCTTTTAATAAAAAG-----TGGTATCTT
Babesia_canis_vogeli     ATTTTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTGCTTTGGCTTTTTCGAGTTCGCTTTTGGGTTTTC
010                      ATTTTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTGCTTTGGCTTTTTCGAGTTCGCTTTTGGGTTTTC
* ** ** * * * ** ** ** *

Hepatozoon_canis          GGTGTGATTTAGCAATGAT---GTCCTTTGAAGTGTTTTTTACTTT---ATTGTAAT
001                      GGTATGTATTTAGCAATGAT---GTCCTTTGAAGTGTTTTTTACTTT---ATTGTAAT
Babesia_canis_vogeli     CCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCGAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGC
010                      CCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCGAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGC
* * * * * * * * * * * * * * * *

Hepatozoon_canis          AAAGCATATT----CAGGACTTT-----TACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCCTAGCAGG
001                      AAAGCATATT----CAGGACTTT-----TACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCCTAGCAGG
Babesia_canis_vogeli     ATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGT
010                      ATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGT
* * * * * * * * * * * * * * * *

Hepatozoon_canis          CCG----ACGCTTT-----
001                      CTG----ACGCTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTAGTTCTACAT
Babesia_canis_vogeli     TAATAGGAACGGTTGGGG-----
010                      TAATAGGAACGGTTGGGG-----
*** **

Hepatozoon_canis          -----
001                      TATTGGTTTTAAGAGCTAAATTAATGATTGATAGGGACAGTTGGGG
Babesia_canis_vogeli     -----
010                      -----

```

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

5.6 Árvore Filogenética

A análise filogenética demonstrou que a subespécie de *Babesia* isolada em um dos animais deste estudo é *B. c. vogeli*, com 100% de similaridade com *B. c. vogeli* já caracterizada por Passos et al. (2005) em cães de área urbana no Brasil. A seqüência também foi idêntica à de *B. c. vogeli* descrita em Okinawa, Japão. Em relação as amostras de *B. c. vogeli* dos EUA e Egito, a similaridade foi de 99%, com o polimorfismo situado em um sítio polimórfico na posição 132 com a amostra dos EUA, representado por uma transversão (A↔C), e na posição 243 com a amostra do Egito, representado por uma transição (T↔C).

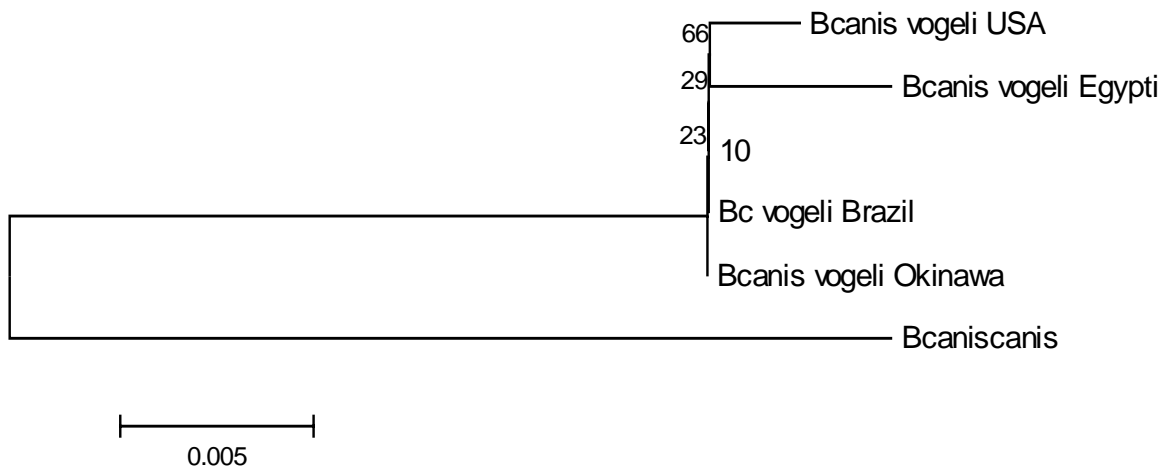


FIGURA 5. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene rDNA de *Babesia* spp. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Babesia canis* obtidas no GenBank foram utilizadas como outgroup. (USA, Egypti, Okinawa, Brazil). 10 - amostra de *B. c. vogeli* de um cão de área rural do estado de São Paulo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Babesia spp. são importantes protozoários transmitidos por carrapatos e que acometem diversas espécies de animais, inclusive os cães. As espécies e subespécies estão distribuídas mundialmente de acordo com a presença dos respectivos vetores. Como a sintomatologia, prognóstico, tratamento e vacinação variam de acordo com as espécies e subespécies de *Babesia*, é muito importante que elas sejam identificadas corretamente, e isso é possível através da utilização de métodos moleculares (BIRKENHEUER et al., 2003a).

No Brasil, poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados e pouco se conhece sobre esse aspecto da infecção por *Babesia* spp. em cães. Além disso, nos trabalhos publicados sobre esse parasito, o diagnóstico da infecção foi feito utilizando métodos sorológicos ou pesquisa de merozoítos em esfregaços sangüíneos, especialmente em cães de áreas urbanas. A caracterização das espécies de *Babesia* com base em dados moleculares é completamente escassa. Em áreas rurais, mais estudos epidemiológicos são necessários para um melhor entendimento da transmissão desse agente para os cães (PASSOS et al., 2005).

Assim, esse trabalho avaliou a infecção de cães de áreas rurais utilizando a técnica de PCR e é inédito no Brasil. Foram observados três cães (2%) positivos pela análise do esfregaço sangüíneo para *Babesia* spp., sendo todos eles detectados através de esfregaços feitos com sangue capilar (ponta de orelha). Este resultado é semelhante ao observado por O'Dwyer et al. (2001) que analisaram esfregaços sangüíneos de 250 cães que viviam em áreas rurais no Rio de Janeiro e encontraram 5,2% deles positivos pelo encontro de merozoítos parasitando as hemácias. Ainda, não foram encontrados animais positivos pela análise de esfregaços feitos com sangue da jugular, o que está de acordo com o relato de Taboada et al. (1991) que afirmaram que a análise do esfregaço do sangue capilar obtido da ponta da orelha ou do coxim aumenta a possibilidade de evidenciar hemácias parasitadas quando comparado ao esfregaço do sangue da jugular.

No presente estudo foram encontrados 12 cães (8%) positivos para *Babesia* spp. pela PCR, técnica de diagnóstico que possui maior sensibilidade e especificidade. O diagnóstico de *Babesia* spp. feito através de microscopia óptica é pouco sensível e específico, e experimentos comparando esta técnica com a PCR nos mostram isso. Macintire et al. (2002) ao estudarem 33 cães, encontraram pela microscopia 10 positivos para *Babesia* spp. (30,3%) enquanto pela PCR foram diagnosticados 18 (54,5%) positivos, representando uma diferença de 55,5%. Inokuma et al. (2004) avaliando 80 cães de rua no Japão encontraram 58,3% (7/12) de animais positivos pela microscopia (8,8%) quando comparados com o número de animais positivos pela PCR (15%). No presente experimento, o diagnóstico pela microscopia foi de 25% (3/12) dos animais positivos quando comparados com o diagnóstico pela PCR, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ e $\chi^2 = 5,68$).

O maior número de machos e de animais adultos encontrados infectados com *Babesia* spp. reflete a diferença entre o número de machos examinados em relação ao número de fêmeas e também ao maior número de animais adultos em relação aos animais jovens.

Assim como descrito por Passos et al. (2005), Sá et al. (2006) e Diniz¹ (2005), que em seus trabalhos verificaram apenas a ocorrência de *B. c. vogeli* em cães no Brasil, a espécie encontrada nos cães de áreas rurais examinados neste trabalho também foi classificada como sendo *B. c. vogeli*, com alta similaridade pela análise genética com o isolado já descrito no país (PASSOS et al., 2005).

Ao contrário do que acontece em áreas urbanas, onde a *Babesia* em cães assume um caráter endêmico devido a alta prevalência nestes animais (PASSOS et al., 2005), foi observado neste estudo que em áreas rurais ela se mostrou pouco freqüente, com apenas 2% de animais positivos pela microscopia e 8% pela PCR. Quando se compara os resultados obtidos nesse trabalho com estudos realizados nesse mesmo Estado por Dell-Porto et al. (1993), que encontraram pela técnica de esfregaço sangüíneo 10,3% de cães infectados e 42,4% pela técnica de IFI, essa diferença entre cães de áreas urbanas e rurais fica evidente. Diniz et al. (2004) e Furuta (2004) empregando somente a técnica de IFI encontraram

55,7% e 67,7% de animais positivos, respectivamente, em estudos realizados em cães de áreas urbanas. Em relação a outros experimentos realizados em dois diferentes estados brasileiros, os resultados encontrados foram semelhantes aos realizados por estes mesmos autores. Ribeiro et al. (1990) e Bastos et al. (2004), em Minas Gerais, encontraram, respectivamente, 66,9% e 31% de animais positivos pela IFI e Trapp et al. (2002), no Paraná, relataram 36% de cães positivos pela técnica de IFI.

A comparação dos dados epidemiológicos quando as técnicas de diagnóstico utilizadas adotam metodologias diferentes é limitada, já que a sorologia não diferencia os animais verdadeiramente positivos, pois a pesquisa de anticorpos nos revela apenas se o animal já teve contato com o parasita. Quando um cão é positivo pela sorologia não significa que ele está infectado por *Babesia*. No caso da PCR, sabe-se que os animais positivos realmente estão infectados pelo parasita, independente se em fase aguda da doença ou em estado de portador assintomático. Portanto, como *Babesia* spp. é considerada endêmica em áreas urbanas no Brasil, é de se esperar que os dados obtidos pela IFI sejam superiores aos obtidos pela PCR.

Os cães criados em áreas rurais vivem soltos e têm acesso livre às matas e outros ambientes, onde são encontrados várias espécies de animais silvestres e domésticos. Nestas condições, os cães podem ser infestados por diferentes espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma* (LABRUNA & PEREIRA, 2001) e adquirir agentes pouco freqüentes em áreas urbanas ou na espécie canina (O'DWYER et al., 2001; SHAW et al., 2001; CRIADO-FORNELIO et al., 2003b).

Rhipicephalus sanguineus, vetor responsável pela transmissão da *B. c. vogeli* no Brasil (PASSOS et al., 2005), é freqüentemente encontrado em áreas urbanas tanto sobre os hospedeiros como em formas de vida livre, escondidos nas frestas e buracos do ambiente onde o cão vive, já que possui hábitos nidícolas (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Soares et al. (2006) realizaram uma avaliação ectoparasitológica em 101 cães procedentes da área urbana de Juiz de Fora – MG, sendo que 50 deles viviam em apartamentos na região central e 51 em casas

com quintais gramados. Os autores verificaram que *R. sanguineus* foi o único carrapato encontrado nos cães estudados, sendo 2% deles nos cães de apartamento e 35% nos cães que viviam em casas. Estudos vêm apontando esta espécie como a mais prevalente em cães no ambiente urbano (RODRIGUES et al., 2001; SZABÓ et al., 2001).

Neste trabalho, 24% dos cães estavam infestados por carrapatos (36/150). O número de animais infestados foi baixo e isto provavelmente é um reflexo do tratamento indiscriminado com carrapaticidas feito pelos proprietários dos animais, que freqüentemente relataram ter realizado algum tipo de controle ou tratamento. O'Dwyer et al. (2001) observaram 37,6% dos cães de áreas rurais do Rio de Janeiro infestados por carrapatos. A porcentagem de animais parasitados por *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. no presente trabalho foi igual (52,7%), o que difere dos dados de Massard (1979), O'Dwyer et al. (2001) e Riera (2002), que relataram que em área rural a prevalência do *Amblyomma* é superior à de *R. sanguineus*. Entretanto, existem alguns casos particulares em que cães de áreas rurais vivem presos ou confinados em áreas cercadas, similares às condições de um ambiente urbano, o que possibilita o estabelecimento de populações de *R. sanguineus* (LABRUNA & PEREIRA, 2001). As espécies de *Amblyomma* encontradas foram *A. cajennense* (25,0%), *A. ovale* (25,0%) e *Amblyomma* spp. (2,7%). Esses achados estão de acordo com Aragão (1936) e Massard et al. (1981), que afirmaram que na região Sudeste as espécies de *Amblyomma* mais freqüentemente encontradas em cães de áreas rurais são *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*, porém, *A. tigrinum* e *A. aureolatum* não foram encontrados neste trabalho.

Quando relacionamos os 12 animais infectados por *B. c. vogeli* e os 19 que possuíam carrapatos, observamos que cinco dos 12 cães positivos (41,6%) para *Babesia* estavam infestados por *R. sanguineus* no momento da coleta das amostras. Desses cinco cães, dois possuíam infestação mista por *Amblyomma* spp. Dos três cães positivos em lâmina, apenas um apresentava carrapato. Há um maior número de cães com *R. sanguineus* e negativos para *Babesia* do que cães com *R. sanguineus* e positivos para *Babesia*, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença estatística entre os cães com

ou sem infestação por *R. sanguineus* e positivos para *Babesia* ($p > 0,05$). Segundo Regendanz & Muniz (1936) e Uilenberg et al. (1989), o vetor da *B. c. vogeli* é o carrapato *R. sanguineus*. No presente estudo não foi observada uma associação positiva entre infestação por *R. sanguineus* e infecção por *Babesia* spp. nos cães. Isto pode ter ocorrido pelo baixo número de animais infectados com o protozoário, o que pode levar a um menor número de carrapatos portadores de *Babesia* spp. A análise estatística também não foi significativa ($p > 0,05$) quando comparamos a infestação por *Amblyomma* spp. e a infecção por *Babesia*.

O percentual de animais positivos encontrado nos revela que a infecção por *Babesia* spp. realmente não é um problema em cães de áreas rurais, considerando que quase metade dos animais infestados por carrapatos estavam parasitados com *R. sanguineus*. Por outro lado, como os cães de áreas rurais têm menos contato com este protozoário e na ausência do parasito não há o desenvolvimento de imunidade efetiva, caso os animais sejam expostos à *Babesia* podem desenvolver sinais clínicos.

Em relação aos municípios estudados, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre Botucatu, Rio Claro e Presidente Prudente no número de animais infectados com *Babesia* spp. Em Rio Claro somente 10,0% dos animais infestados pelo *R. sanguineus* apresentaram a infecção por *Babesia* spp. Em Presidente Prudente apenas dois cães estavam infectados com *Babesia* e foi o local onde se encontrou o menor número de cães parasitados por carrapatos, com predominância para *R. sanguineus* (4/6). A comparação dos resultados obtidos nas três cidades ficou prejudicada pelo pequeno número de animais infectados com *Babesia* e infestados com carrapatos.

Apesar de *R. sanguineus* ser considerado o vetor potencial de *B. gibsoni* (HIGUCHI et al., 1995; HIGUCHI et al., 1999), e de haver dois relatos no Brasil da existência dessa espécie baseados apenas em microscopia óptica (BRACCINI et al., 1992; LUCIDI et al., 2004), *B. gibsoni* não foi encontrada no presente estudo.

Na eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose à 2%, foram observadas bandas de aproximadamente 500 pb, que após o seqüenciamento verificou tratar-se de *H. canis*. Os oligonucleotídeos PIRO A1 e PIRO B utilizados

nesse estudo foram inicialmente designados como sendo específicos para o gênero *Babesia* (JEFFERIES et al., 2003). Para assegurar que não amplificavam DNA de outros parasitas caninos, esses oligonucleotídeos foram testados por esses mesmos autores utilizando DNA de *Ehrlichia canis*, *E. platys*, *Rickettsia rickettsia*, *Bartonella vinsonii*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria immitis*, mas não com DNA de *Hepatozoon* spp. pois este parasita não é encontrado na Austrália. Portanto, os resultados do presente trabalho indicam que essas seqüências iniciadoras não são específicas para o gênero *Babesia* pois são capazes de amplificar outro piroplasmídeo de cães. Entretanto, como as bandas apresentam cerca de 70 pb de diferença, *Babesia* e *Hepatozoon* podem ser facilmente diferenciados pela eletroforese em gel de agarose a 2%.

A mesma situação foi observada por Oyamada et al. (2005), que utilizando os oligonucleotídeos Babesia-F (GTG AAA CTG CGA ATG GCT CA) e Babesia-R (CCA TGC TGA AGT ATT CAA GAC), antes relatados como específicos para o gênero *Babesia*, verificaram que amplificam DNA de *Babesia* e *Hepatozoon* simultaneamente. Esses dados reforçam as pesquisas de que, com uma única reação de PCR, é possível detectar com sucesso esses dois gêneros, simultaneamente, em amostras de sangue canino, já que possuem diferença de tamanho.

A hipótese de que poderíamos observar espécies ou subespécies diferentes em cães de áreas rurais, quando comparados aos cães de áreas urbanas, não se confirmou. Observamos que, apesar da infecção dos cães não ser endêmica em áreas rurais, a subespécie encontrada é *B. c. vogeli* e é provável que esta seja a única subespécie que infecta os cães no Brasil. Entretanto, devido à extensão territorial do Brasil e às diferenças climáticas e epidemiológicas, acreditamos que estudos semelhantes devam ser conduzidos para que possamos ampliar o nosso conhecimento sobre a infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do Brasil.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O estudo realizado em cães de áreas rurais dos municípios de Botucatu, Rio Claro e Presidente Prudente, no estado de São Paulo nos permitiu concluir que:

1- A frequência de infecção por *Babesia* em cães de áreas rurais do estado de São Paulo foi baixa.

2- A espécie de *Babesia* que infecta cães de áreas rurais do estado de São Paulo é *B. c. vogeli*.

3- Não houve diferença entre o número de cães infestados por *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma* sp.

4- Os oligonucleodídeos Piro A1 e Piro B, não são específicos para *Babesia* spp. e amplificam também o DNA de *Hepatozoon* spp.

5- A técnica de PCR é mais sensível e deve ser utilizada em estudos epidemiológicos.

6- Não houve associação positiva entre a infestação por *R. sanguineus* e a infecção por *Babesia* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.F., MAGNARELLI, L.A., SULZER, A.J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 2102-5, 1980.
- ANO, H., MAKIMURA, S., HARASAWA, R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by Polymerase Chain Reaction. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 111-3, 2001a.
- ANO, H., MAKIMURA, S., HARASAWA, R. Comparison of partial ribosomal DNA sequences of *Babesia gibsoni* occurring in Miyasaki prefecture, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 561-2, 2001b.
- ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 759-843, 1936.
- ARAGÃO, H., FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-48, 1961.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. **C. R. Acad. Sci.**, v. 107, p. 692-94, 1888.
- BASTOS, C.V., MOREIRA, S.M., PASSOS, L.M.F. Restrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1026, p.158-60, 2004.
- BICALHO, K.A., RIBEIRO, M.F.B., MARTINS-FILHO, O.A. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan *Babesia canis* infection in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 221-35, 2004.
- BIRKENHEUER, A.J., LEVI, M.G., SAVARY, K.C., GAGER, R., BREITSCHWERDT, E. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, p. 125-8, 1999.
- BIRKENHEUER, A. J., LEVI, M. G., BREITSCHWERDT, E. Development and evaluation of a seminested PCR for detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4172-7, 2003a.

- BIRKENHEUER, A. J., LEVI, M. G., TEBBINS, M., POORE, M., BREITSCHWERDT, E. Serosurvey of Anti*Babesia* antibodies in stray dogs and American Pit Bull Terriers and American Staffordshire Terriers from North Carolina. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 39, p. 551-7, 2003b.
- BIRKENHEUER, A.J., NEEL, J., RUSLANDER, D., LEVY, M.G., BREITSCHWERDT, E. B. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. **Vet. Parasitol.**, v. 124, p. 151-60, 2004.
- BOBADE, P.A., ODUYE, O.O. Antibody titres in naturally occurring *Babesia canis* infection in dogs. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.**, v.39, p.185-8, 1986.
- BOOZER, A.L., MACINTIRE, D.K. Canine Babesiosis. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 33, p. 885-904, 2003.
- BRACCINI, G.C., CHAPLIN, E.L., STOBBE, N.S., ARAUJO, F.A.P., SANTOS, N.R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, nos anos de 1986 a 1990. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 20, p. 134-49, 1992.
- BRANDÃO, L.P., HAGIWARA, M.K., MYIASHIRO, S.I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Vet. Parasitol.**, v. 114, p. 253-65, 2003.
- CACCIÒ, S.M., ANTUNOVIC, B., MORETTI, A., MANGILI, V., MARINCULIC, A., BARIC, R.R., SLEMENDA, S.B., PIENIAZEK, N.J. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 285-92, 2002.
- CAMACHO, A. T., PALLAS, E., GESTAL, J. J., GUITIAN, F. J., OLMEDA, A. S., GOETHERT, H. K., TELFORD, S. R. Infection of dogs in north-west Spain with *Babesia microti*-like agent. **Vet. Record**, v. 149, p. 552-5, 2001.
- CARRET, C., WALAS, F., CARCY, B., GRANDE, N., PRECIGOUT, E., MOUBRI, K., SCHETTERS, T.P., GORENFLOT, A. *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.**, v. 46, p. 298-303, 1999.

- CITARD, T., MAHL, P., BOULOUIS, H.J., CHAVIGNY, C., DRUILHE, P. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed restriction fragment length polymorphism analysis. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, p. 172-9, 1995.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBA-CARRETRO, A. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 307-17, 2003a.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBA-CARRETRO, A. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Vet. Parasitol.**, v. 114, p. 173-94, 2003b.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBA-CARRETRO, A. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol.**, v. 113, p. 189-201, 2003c.
- DEAN, A.G., DEAN, J.A., COULOMBIER, D., BRENDI, K.A., SMITH, D.C., BURTON, A.H. et al. **Epiinfo Version 6: a Word-Processing, Database and Statistics Program for Public Health on IBM – Compatible Microcomputers**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1995.
- DELL-PORTO, A., OLIVEIRA, M.R., MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs of the city of São Paulo. Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.
- DINIZ, P.P.V.P. et al. *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leptospira interrogans* infection frequency in dogs with suspected hemoparasitosis. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, p. 367, 2004.
- EWING, I.J. Method of reproduction of *Babesia canis* in erythrocytes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 26, p. 727-33, 1965.

- FARWELL, G.E., LeGRAND, E.K., COBB, C.C. Clinical observation on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.180, p.507-11, 1982.
- FELSEINSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies an approach using the bootstrapp. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FUKUMOTO, S., XUAN, X., SHIGENO, S., KIMBITA, E., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 977-81, 2001.
- FUKUMOTO, S. XUAN, X. INOUE, N., IGARASHI, I., SUGIMOTO, C., FUJISAKI, K., NAGASAWA, H., MIKAMI, T., SUZUKI, H. Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v. 131, p. 129-36, 2003.
- FUKUMOTO, S., SUZUKI, H., IGARASHI, I., XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1031-5, 2005.
- FURUTA, P.R. **Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*.** Jaboticabal, 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence interval for multinomial proportions. **Technometrics**, v. 7, p. 247-54, 1965.
- HAUSCHILD, S., SHAYAN, P., SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 638-42, 1995.
- HIGUCHI, S., FUJIMORI, M., HOSHI, F., KAWAMURA, S., YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the salivary glands of the larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p. 117-9, 1995.

- HIGUCHI, S. IZUMITANI, M., HOSHI, H., et al. Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p. 689-691, 1999.
- INOKUMA, H., YOSHIZAKI, Y., MATSUMOTO, K., OKUDA, M., ONISHI, T., NAKAGOME, K., KOSUGI, R., HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Vet. Parasitol.**, v. 121, p. 341-6, 2004.
- IRIZARRY-ROVIRA, A.R., STEPHENS, J., CHRISTIAN, J., KJEMTRUP, A., DeNICOLA, D.B., WIDMER, W.R., CONRAD, P.A. *Babesia gibsoni* infection in a dog from Indiana. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 30, p. 180-8, 2001.
- ITOH, N., HIGUCHI, S., KAWAMURA, S. The effect of diminazene aceturate on splenectomized dogs with *Babesia gibsoni* infection. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 17, n. 4, p. 94-98, 1998.
- JACOBSON, L.S., LOBETTI, R.G. Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis. **J. Small Anim. Pract.**, v. 37, p. 286-91, 1996.
- JEFFERIES, R., RYAN, U.M., MUHINICKEL, C.J., IRWIN, P.J. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 409-12, 2003.
- KJEMTRUP, A.M., THOMFORD, J., ROBINSON, T., et al. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. **Parasitology**, v. 120, p. 487-93, 2000.
- KJEMTRUP, A.M., CONRAD, P.A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Vet. Parasitol.**, 2006. In press.
- KJEMTRUP, A.M., WAINWRIGHT, K., MILLER, M., PENZHORN, B.L., OCARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. **Vet. Parasitol.**, 2006. In press.
- KOCAN, A.A., KJEMTRUP, A., MEINKOTH, J., WITHWORTH, L.C., MURPHY, G.L., DECKER, L., LORENZ, M. A genotypically unique *Babesia gibsoni*-like parasite recovered from a dog in Oklahoma. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 437-8, 2001.

- KRAUSE, P. J., TELFORD III, J., SPIELMAN, A., RYAN, R., MAGERA, J., RAJAN, T. V., CHRISTIANSON, D., ALBERGHINI, T. V., BOW, L., PERSING, D. Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2791-4, 1996.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. et al. MEGA2: **Molecular evolutionary genetics analysis software**. Arizona State University, Tempe, 2001.
- LABRUNA, M.B., PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clin. Vet.**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.
- LEVINE, N.D. Nomenclatural corrections and new taxa in the apicomplexan protozoa. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 103, p. 195-206, 1984.
- LOBETI, R.G. Canine Babesiosis. **Compendium.**, v.20, p.418-31, 1998.
- LUCIDI, C.A., ANGERAMI, J.T.S., RODRIGUES, R.R., TAKAHIRA, R.K. Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no Estado de São Paulo: Nota preliminar. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, p. 231, 2004.
- MACINTIRE, D.K., BOUDREAUX, M.K., WEST, G.D., BOURNE, C., WRIGHT, J.C., CONRAD, P.A. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 220, p. 325-9, 2002.
- MARTINOD, S., BROSSARD, M., MOREAU, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic areas. **J. Parasitol.**, v. 71, p. 269-73, 1985.
- MASSARD, C.A. **Hepatozoon canis (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) em cães do Brasil, com revisão do gênero em membros da ordem Carnívora**. 1979. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1979.
- MASSARD, C.A., MASSARD, C.L., MASSARD, H.E.B., BIANCHINI, I., FONSECA, A.H. Carrapatos de cães em áreas rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., 1981, Belo Horizonte. SBP, **Anais...** Belo Horizonte: SBP, 1981. p. 201.

- MEINKOTH, J.H., KOCAN, A.A., LOUD, S.D., LORENZ, M.D. Clinical and hematologic effects of experimental infection of dogs with recently identified *Babesia gibsoni*-like isolates from Oklahoma. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 220, p. 185-9, 2002.
- MIYAMA, T., SAKATA, Y., SHIMADA, Y., OGINO, S., WATANABE, M., ITAMOTO, K., OKUDA, M., VERDIDA, R.A., XUAN, X., NAGASAWA, H., INOKUMA, H. Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in Eastern Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, p. 467-71, 2005.
- O'DWYER, L.H., MASSARD, C.L., SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 94, p. 143-50, 2001.
- O'DWYER, L.H., MASSARD, C.L. Babesiose. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. livros de vet. LTDA, p. 58-64, 2002.
- OYAMADA, M., DAVOUST, B., BONI, M., DEREURE, J., BUCHETON, B., HAMMAD, A., ITAMOTO, K., OKUDA, M., INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossii*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, n. 11, p. 1343-46, 2005.
- OTSUKA, H. Studies on transmission of *Babesia gibsoni* Patton (1910) by *Haemaphysallis longicornis* Neumann (1901). **Bull. Fac. Agric. Miyasaki Univ.**, v. 21, p. 359-367, 1974.
- PARAENSE, W.L., VIANNA, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 46, p. 595-603, 1949.
- PASSOS, L.M.F., GEIGER, S.M., RIBEIRO, M.F.B., PFISTER, K., ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 81-5, 2005.
- REGENDANS, P., MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 81-4, 1936.

- RIBEIRO, M.F.B., LIMA, J.D., PASSOS, L.M.F., GUIMARÃES, A.M. Frequência de Anticorpos Fluorescentes Anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 42, p. 511-7, 1990.
- RIERA, M.D.F. Estudos da infecção natural por *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães (*Canis familiares*) de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro. 2002. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.
- RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC Press Inc., 1988, 255p.
- RODRIGUES, A.F.S.F., DAEMON, E., D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitas em cães de rua no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 10, n. 01, p. 13-19, 2001.
- SÁ, A.G., CERQUEIRA, A.M.F., O'DWYER, L.H., MACIEIRA, D.B., ABREU, F.S., FERREIRA, R.F., PEREIRA, A.M., VELHO, P.B., ALMOSNY, N.R.P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected brazilian dogs. **Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v. 4, p. 163-8, 2006.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. v. 3.
- SCHETTERS, T.P., MOUBRI, K., PRECOGOUT, E., KLEUSKENS, J., SCHOLTES, N.C. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, p. 485-93, 1997.
- SHAW, S. E., DAY, M. J., BIRTLES, R. J., BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 74-80, 2001.
- SHORTT, H.E. Life-history and morphology of *Babesia canis* in the dog-tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Ind. J. Med. Res.**, v. 23, p. 885-920, 1936.
- SHORTT, H.E. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 119-148, 1973.
- SMITH, T., KILBORNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts. **U.S. Dept. Agric. Bur. Anim. Industr.**, p.177-304, 1893.

- SOARES, A.L., SOUZA, A.D., FELICIANO, E.A, RODRIGUES, A.F.S.F., DÁGOSTO, M., DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 15, p. 13-16, 2006.
- STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zbl. Bakt. I. Abt.**, v. 14, p. 1-8, 1893.
- SWAMINATH, C. The arthropod vector of *Babesia gibsoni*. **Indian J. Med. Res.**, v. 25, p.499-503, 1937.
- SZABÓ, M.P.J., CUNHA, T.M., PINTER, A., VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 25, n. 10-11, p. 909-916, 2001.
- TABOADA, J, MERCHANT, S.R. Babesiosis of companion animals and man. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 103-23, 1991.
- TABOADA, J. Babesiosis. In: Greene C. **Infectious disease of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. p. 473-81.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Acids. Res.**, v. 22, p. 4673-80, 1994
- TRAPP, S.M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in south Brazil. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, p. 365, 2002.
- UILENBERG, G., FRANSSSEN, F.F., PERIE, N.M., SPANJER, A., A. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet. Q.**, v. 11, p. 33-40, 1989.
- WENYON, C.M. **Protozoology: A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists**. Vol.II. London: Balliere, Tindall and Cox, 1926. 1563p.
- YAMANE, I., GARDNER, I.A., RYAN, C.P., LEVY, M., URRICO, J., CONRAD, P.A. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. **Prevent. Vet. Med.**, v. 18, p. 293-304, 1994.

- ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 544-48, 1998.
- ZAHLER, M., RINDER, H., SCHEIN, E., GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 89, p. 241-8, 2000a.
- ZAHLER, M., RINDER, H., ZWEYGARTH, E., FUKATA, T., MAEDE, Y., SCHEIN, E., GOTHE, R. *Babesia gibsoni* of dogs from North America and Asia belong to different species. **Parasitology**, v. 120, p. 365-9, 2000b.