



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLAVIO SHIGUERU JOJIMA

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *Babesia* EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO
HOSPITALAR DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.**

Londrina - Paraná
2007

FLAVIO SHIGUERU JOJIMA

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *Babesia* EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO
HOSPITALAR DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina – Paraná

2007

FLAVIO SHIGUERU JOJIMA

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES
DE *Babesia* EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO HOSPITALAR DA
REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.**

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Odilon Vidotto – Universidade
Estadual de Londrina – Departamento de
Medicina Veterinária Preventiva.**

**Prof. Dr. João Luis Garcia – Universidade
Estadual de Londrina – Departamento de
Medicina Veterinária Preventiva.**

**Profa. Dra. Suely Nunes Esteves Beloni –
Universidade Estadual de Londrina –
Departamento de Clínicas Veterinárias**

Londrina, 02 de Abril de 2007.

DEDICATÓRIA

**À minha esposa Claudia, pelo amor,
compreensão e dedicação.**

**Ao meu filho Felipe, que sempre demonstra
carinho nas horas mais difíceis.**

**À minha filha Fernanda, que ainda está por
vir, mas que vai encher a vida de alegria.**

**Aos meus pais e irmãos, que sempre me
apoiaram mesmo estando tão longe.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, meus pais, que me apoiaram, compreenderam os meus sonhos e me ajudaram nessa caminhada mesmo estando tão longe. Minha esposa e filhos que sempre em momentos difíceis, estiveram do meu lado, me confortando ou me alegrando. Meus irmãos, que sempre me aconselharam em momentos onde eu não conseguia ver saídas. À minha sogra e meu sogro, que me acolheram e me deram uma nova família.

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto, pela orientação, sugestões, críticas, compreensão, conselhos, incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto, pela disposição, ajuda e conselhos durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Luís Garcia, pela ajuda em momentos difíceis e pela compreensão.

À Profa Dra Mara Regina Stipp Balarin que disponibilizou o Laboratório de Patologia Clínica para realização dos Hemogramas e pela enorme ajuda nas dúvidas em relação à interpretação dos mesmos.

Ao Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura, por ter participado da banca de qualificação e pelas dicas valiosas para o melhoramento da dissertação.

À médica veterinária Elizabete Regina Marangoni Marana, pela enorme ajuda, pela disposição, compreensão e amizade.

À técnica Dalva Maria Navarro Fabricio, pela enorme ajuda no momento das coletas de amostras.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Clínica, João Cardozo e José Roberto Campos de Magalhães, pela ajuda e compreensão nos momentos em que permanecia no Laboratório para coleta de material.

Aos meus amigos e colegas do curso de graduação e pós-graduação, principalmente Claudia Boseli, Kleber Moreno, Juliana Dias, Karina Flaiban, Luciana Takemura, Danilo Martins, Kelly Ito, Alexandre Amude, Juliana Satie, Juliana Miyazaki, Carlos Alexandre, Carolina Gimenez, Mônica Oyafuso, Fabio Galli, David Polwony, Daniella Moreira, Maria Juliana, José Aduino, Andreia Hamasaki, Isabela Tormes, Viviane Vieira, Melissa, entre outros que tanto me ajudaram nessa caminhada.

Aos meus amigos de Umuarama, Juliana Galhardo, Ricardo, Flavio, Fabricio, Leonardo, Fabio e Adriana, que sempre me incentivaram e deram força nos momentos de dificuldade.

Às minhas colegas de Laboratório, Flora, Katia e Michele, que me ajudaram em momentos que eu me senti perdido.

Aos residentes e professores da Clínica médica e cirúrgica de animais de companhia, que me auxiliaram na obtenção das amostras.

Ao Prof. Dr. Helio Autran de Moraes, que foi quem acreditou em mim e iniciou a minha caminhada à pesquisa e docência.

Ao estagiário Andrei Kelliton Fabretti, que me auxiliou na coletas das amostras.

A aqueles que direta ou indiretamente contribuiu de alguma forma para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação.

JOJIMA, Flavio Shigueru. **Ocorrência e caracterização molecular das espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, Paraná.** 2007. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina, 2007.

RESUMO

A Babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Babesia*. *Babesia canis* e *B. gibsoni* são as duas espécies que causam infecção natural em cães. Três subespécies de *B. canis* são reconhecidas, em função do vetor, da patogenicidade e localização geográfica: *B. canis canis*, transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*, está presente na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, ocorre nas regiões tropical e subtropical; e *B. canis rossi*, transmitida pelo *Haemaphysalis leachi* descrita na África do Sul. A existência destes três genogrupos foi comprovada por estudos genéticos. A cepa da África do Sul, transmitida pelo *H. leachi*, é considerada a mais patogênica. A *B. gibsoni* é transmitida pelo *H. bispinosa* e *R. sanguineus* e está correlacionada com a distribuição geográfica dessas espécies de carrapatos. O objetivo do trabalho foi avaliar a infecção por espécies de *Babesia* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. Foram selecionados 282 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de abril de 2005 à maio de 2006 que apresentavam anemia (VG < 25%), trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150.000/mm³), leucopenia (contagem de leucócitos totais < 5.000/mm³) ou uma combinação de duas ou três dessas alterações no momento da consulta. A presença de *Babesia* sp foi constatada através da detecção do material genômico do gênero *Babesia* pela PCR. A infecção por *Babesia* sp foi identificada em 105 (37,2%) cães de um total de 282. Destas 105 amostras positivas, a PCR-RFLP identificou 66 amostras (62,8%) com perfil de clivagem compatível com a *B. canis vogeli* e 39 (37,2%) para a *B. gibsoni*. Como conclusões, os resultados obtidos permitem afirmar que a babesiose é um importante diferencial para animais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia; a *B. canis vogeli* é a subespécie que está presente na maioria dos casos de babesiose na população de cães estudada e a *B. gibsoni* também está presente causando babesiose, em cães da região de Londrina, Paraná.

Palavras-chave: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, cães, anemia, leucopenia, trombocitopenia, PCR.

JOJIMA, Flavio Shigueru. **Occurrence and molecular characterization of Babesia species in a canine hospital population in Londrina region, Parana State, Brazil.** 2007. 55f. Dissertation. (Master's degree in Animal Science) – Preventive Veterinary Medicine Department – Agrarian Science Center – Londrina State University, 2007.

ABSTRACT

Canine babesiosis is a worldwide disease caused by the protozoan of the genus *Babesia*. *Babesia canis* and *B. gibsoni* are both species that naturally infect dogs. Three sub-species are recognized in function of the vector, pathogenicity and geographic localization: *B. canis canis*, transmitted by *Dermacentor reticulatus*, which is present in Europe; *B. canis vogeli*, transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*, that occurs in tropical and subtropical regions; and *B. canis rossi*, transmitted by *Haemaphysalis leachi*, described at South Africa. The existence of these three sub-species was confirmed by genetic studies. The South Africa strain, transmitted by *H. leachi* is considered the most pathogenic. The *B. gibsoni* is transmitted by *H. bispinosa* and *R. sanguineus* and it is correlated with the geographic distribution of the tick species. The objective of this study was to evaluate the infection of *Babesia* species in dogs attended at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL). It was selected two hundred and eighty two dogs seen at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL) between April of 2005 and May of 2006. They presented anemia (Packed Cell Volume < 25%), thrombocytopenia (Platelet count < 150,000/mm³), leukopenia (White blood cell count < 5,000/mm³) or a combination of two or three of these alterations at the moment of the consultation. The presence of *Babesia* sp was determined by the detection of genomic material of the genus *Babesia* by PCR. It was confirmed 105 (37.2%) cases of babesiosis from 282 dogs. Microscopic examination of Giemsa-stained blood smears detected 38 (13.5%) positive samples against 105 identified by PCR from 282 dogs. All the positive samples were submitted to PCR-RFLP with the *Hinf I* and 66 (62.8%) were positive for *B. canis vogeli* and 39 (37.2%) were positive for *B. gibsoni*. As conclusions, the results obtained allow to affirm that the babesiosis is an important differential for dogs that present anemia, leukopenia and thrombocytopenia and, *B. canis vogeli* is the subspecies that is present in the most of the cases of babesiosis in the population of dogs studied and, that *B. gibsoni* is also present causing babesioses in dogs of the Londrina region, Parana State, Brazil.

Key-Words: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, dogs, anemia, leukopenia, thrombocytopenia, PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarose representativo corado com Brometo de Etídeo dos produtos amplificado para o gênero *Babesia* e com peso molecular de 460 pb. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo para *B. canis*, canaletas 3 a 8: amostras e canaleta 9: água.....43

Figura 2. Sensibilidade da PCR para detecção de *Babesia* em gel de agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídeo. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo com parasitemia de 13% sem diluição, canaletas 3 a 12: diluição de 10^{-1} a 10^{-10} , e canaleta 13: água.....44

Figura 3. Perfil de clivagem da enzima de restrição *Hinf I* em gel de agarose metaphor a 2% corado com Brometo de Etídeo, demonstrando o perfil de clivagem da enzima de restrição *Hinf I*. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo não clivado, canaletas 3: controle positivo clivado com a enzima de restrição *Hinf I*, com bandas sugestiva de *B. canis vogeli*, canaleta 4 e 5: amostra não clivada e clivada com bandas sugestivas de *B. canis. vogeli*, canaletas 6 a 9: amostras não clivadas e clivadas com a enzima de restrição *Hinf I*, com bandas sugestivas de *B. gibsoni*, e canaleta 10: água.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos pelo Giemsa com a PCR.....	46
Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos pelo Giemsa com a PCR-RFLP.....	46
Tabela 3. Resultados obtidos na PCR e na PCR-RFLP segundo os critérios de inclusão.....	46
Tabela 4. Resultados obtidos na PCR e PCR-RLFP levando em consideração o sexo dos animais estudados.....	46
Tabela 5. Resultados obtidos na PCR e PCR-RLFP levando em consideração a raça dos animais estudados.....	47
Tabela 6. Resultados obtidos na PCR e PCR-RLFP levando em consideração a faixa etária dos animais estudados.....	47
Tabela 7. Preparação do Tampão AW1.....	49
Tabela 8. Preparação do Tampão AW2.....	49

SUMÁRIO

I. Revisão de Literatura.....	12
1. Introdução.....	13
2. Epidemiologia.....	14
3. Ciclo Biológico.....	15
4. Transmissão.....	16
5. Patogenia.....	17
6. Sinais Clínicos.....	17
7. Diagnóstico.....	19
8. Tratamento.....	20
9. Referências.....	22
II. Objetivos.....	26
Objetivo Geral.....	27
Objetivos Específicos.....	27
III. Artigo para publicação.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	33
População de cães.....	33
Colheita de Amostras.....	34
Hemograma.....	34
Esfregaço Sangüíneo.....	34
Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase.....	34
Extração de DNA.....	34
PCR para o gênero <i>Babesia</i>	35
Teste de Sensibilidade.....	35
Análise do Produto Amplificado.....	35
PCR-RFLP.....	36
Seqüenciamento do Material Amplificado.....	36
Análise Estatística.....	36
Resultados e Discussão.....	37
Referências.....	40
IV. Conclusões Gerais.....	48
V. Apêndice.....	49

I. REVISÃO DE LITERATURA - BABESIOSE CANINA

1. INTRODUÇÃO

A Babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Babesia*, pertencente ao Filo Protozoa, Sub-filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Piroplasmorida, Família Babesidae e Gênero *Babesia*. *Babesia canis* e *B. gibsoni* são as principais espécies que causam infecção natural em cães (TABOADA, 1998). A *Babesia canis* é uma grande *Babesia*, cujas formas piriformes variam de 2,61 a 5,22 μm de comprimento (O'DYER, 1996). Além das formas piriformes, predominam parasitos redondos, ovais, alongados ou amebóides. As hemáceas podem ser parasitadas com quatro, oito ou mais trofozoítos. Também é freqüente o encontro de formas livres no plasma, bem como hemáceas fagocitadas no interior de macrófagos (O'DYER, 1996). A *Babesia gibsoni* é uma pequena *Babesia*, apresentando geralmente formas redondas ou ovais que variam de 1,0 a 3,2 μm e aparecem nas hemáceas geralmente sozinhas (TABOADA, 1998; LOBETTI, 1998).

A *Babesia canis* foi descrita pela primeira vez por Piana & Galli-Valerio em 1895, na Itália. A partir da primeira descrição, *B. canis* foi observada na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte e América do Sul (MARTINOD; LAURENT; MOREAU, 1986; UILENBERG *et al*, 1989). No Brasil, a babesiose canina foi caracterizada em alguns estados, como no Rio Grande do Sul (BRACCINI *et al*, 1992), São Paulo (DELL'PORTO *et al*, 1993), Pernambuco (DANTAS-TORRES *et al*, 2004), Rio de Janeiro (GUIMARÃES *et al*, 2004), Minas Gerais (BASTOS *et al*, 2004) e Paraná (TRAPP *et al*, 2006).

Três subespécies de *B. canis* são reconhecidas, em função do vetor, da patogenicidade e localização geográfica: *B. canis canis*, transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*, está presente na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, ocorre nas regiões tropical e subtropical; e *B. canis rossi*, transmitida pelo *Haemaphysalis leachi* descrita na África do Sul (UILENBERG *et al*, 1989; LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998.). A existência destes três genogrupos foi comprovada por estudos

genéticos (CARRET *et al*, 1999; ZAHLER *et al*, 1998). A cepa da África do Sul, transmitida pelo *H. leachi*, é considerada a mais patogênica. A *B. gibsoni* é transmitida pelo *Haemaphysalis bispinosa* e *R. sanguineus* e está correlacionada com a distribuição geográfica da espécie (TABOADA, 1998).

Recentemente, foi identificada uma nova espécie de *Babesia* parasitando cães na Califórnia. Trata-se de uma pequena babesia que apresenta características parecidas com a *Babesia microti* e a *Theileria* spp. A nova espécie foi denominada de *B. conradae*. Acredita-se que esta nova espécie seja transmitida pelo *R. sanguineus*, pela via transtadial (KJEMTRUP *et al*; 2006). Outra espécie de *Babesia* foi caracterizada na Carolina do Norte, USA, causando doença em um cão. O animal apresentava anemia, trombocitopenia e leucopenia. Trata-se de uma grande babesia que na caracterização genética apresentou homologia de 93,9% com a sequência da *B. bigemina* e 93,5% com a *B. caballi*. Quando comparada à *B. canis vogeli*, *B. canis canis* e *B. canis rossi*, o isolado apresentou apenas 91,2 – 91,6% de homologia (BIRKENHEUER *et al*; 2004).

2. EPIDEMIOLOGIA

Estudos realizados com isolados brasileiros de babesias de cães mostram que no Brasil a babesiose canina é causada predominantemente pela *B. canis vogeli*, com relatos de ocorrência de *B. gibsoni* no sul do país (TRAPP *et al*, 2006).

Passos *et al* (2005) realizaram PCR em cinco cães positivos no esfregaço sanguíneo. O sequenciamento desses produtos obtidos na PCR mostrou que as amostras apresentavam 100% de compatibilidade entre si. A comparação com outras sequências de *B. canis vogeli* disponíveis no GenBank demonstrou que as amostras apresentavam similaridade de 100% com a cepa do Japão, 99,4% com as cepas da Austrália, Estados Unidos, França, Espanha, Egito 2 e África do Sul. Em relação à cepa Egito 1 verificou-se uma diferença em

apenas 2 pares de bases indicando que a espécie que provavelmente está envolvida nos casos de Babesiose no Brasil é a *B. canis vogeli*.

A *B. gibsoni* foi identificada em quatro de 16 amostras de sangue de cães utilizando a PCR em isolados de casos clínicos em Londrina, Paraná (TRAPP *et al*; 2006b). As amostras apresentavam inclusões intra-eritrocitárias e todas eram soronegativas para *B. canis* pela IFI. As amostras positivas para *B. gibsoni* apresentaram uma homologia de 99% com a *B. gibsoni* Ásia 1. Dois cães positivos apresentaram coinfeção com *Ehrlichia canis* e dois com *Mycoplasma haemocanis*. O *R. sanguineus* pode ser o principal transmissor da *B. gibsoni*, já que 96% dos carrapatos coletados de cães desta região eram *R. sanguineus* (OYAFUSO *et al*; 2002; TRAPP *et al* 2006a).

3. CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico no hospedeiro vertebrado ocorre unicamente no interior das hemáceas, com o parasito se dividindo assexuadamente. No carrapato ocorre um ciclo complexo, com fusão de gametas no interior das células intestinais e formação de um zigoto móvel, alongado, conhecido como esporocineto. Este invade a hemolinfa do artrópode, alcançando todos os órgãos, onde se multiplica. No caso das fêmeas, os esporocinetos presentes no ovário atingirão seus ovos e a larva já nasce infectada. Quando a larva começa a se alimentar, os parasitos migram para a glândula salivar e vão sofrer novas divisões e transformações, com a formação de esporozoítos infectantes. Ciclo semelhante ocorre nas ninfas e nos adultos dos carrapatos (MELHORN; SCHEIN; VOIGT, 1980; O'DWYER; MASSARD; DAEMON, 1997^a; O'DWYER; MASSARD; DAEMON, 1997^b; SCHEIN; MELHORN; VOIGT, 1979; SHORTT, 1936; SHORTT, 1973).

4. TRANSMISSÃO

A transmissão das Babesias é pela picada do carrapato infectado e pela inoculação de esporozoítos, porém nos casos de *B. gibsoni*, pode ocorrer infecção em animais que se envolveram em brigas. Em um estudo realizado no Japão com cães da raça Tosa com histórico de brigas e sem histórico de brigas, demonstrou maior incidência de *Babesia gibsoni* no grupo com histórico de brigas. Os autores sugerem que os cães dessa raça possam se infectar com o sangue do animal parasitado no momento da briga (MATSUU *et al*, 2004). Transmissão transplacentária provavelmente ocorre no cão podendo resultar em filhotes fracos (TABOADA, 1998).

Na grande maioria dos casos de infecção por *Babesia* sp ocorre transmissão transovariana, onde a fêmea do carrapato infectada transmite o parasito para sua prole. Posteriormente, as larvas que nascem infectadas, ao mudarem de estágios carregam a *Babesia*, transmitindo-a. Esta forma de transmissão, conhecida como transmissão vertical, é particularmente importante quando o vetor é um carrapato de três hospedeiros. No entanto, larvas são transmissoras pouco eficientes, necessitando de um grande numero delas para que os cães se infectem (O'DWYER, 1996; SHORTT, 1936; SHORTT, 1973).

Foi caracterizada a transmissão transplacentária da *B. gibsoni*. No estudo, um grupo de cadelas prenhas foram infectadas e outro grupo não. Nas cadelas do grupo infectado, houve um abortamento e o nascimento de quatro filhotes. No grupo controle houve nascimento normal de cinco filhotes. Todos os quatro filhotes do grupo infectado apresentaram hipotermia, coma, anemia, disorexia, esplenomegalia e hepatomegalia. Foram submetidos à PCR e todos eram positivos indicando que houve infecção desses filhotes, provavelmente por via transplacentária, já que as mães eram livres do parasita e os filhotes não entraram em contato com o agente após o nascimento (FUKUMOTO *et al*; 2005).

5. PATOGENIA

A patogenia da babesiose está relacionada com a ação hemolítica, intra e extravascular, variando com a espécie de *Babesia*, com a cepa, dose infectante, imunidade e idade do hospedeiro. A hemólise intravascular se inicia após um curto período em que a *Babesia* inicia sua multiplicação e em que o animal permanece assintomático. A partir de então, inicia-se o quadro de anemia regenerativa com aumento de reticulócitos e hemáceas nucleadas na circulação. Apresentam hemoglobinemia, hemoglobinúria e bilirrubinemia. O aumento da destruição de hemáceas, intravascular e pelo sistema fagocítico mononuclear, leva a uma sobrecarga hepática, surgindo icterícia. Ocorre congestão hepática e esplênica, e hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear, com conseqüente aumento de baço e fígado. O aumento da formação de bilirrubina, devido a maior destruição de hemáceas leva a um acúmulo de bile e conseqüentemente distensão da vesícula biliar. A liberação de pirógenos, devido à destruição dos eritrócitos, leva ao quadro de febre, que pode ser bastante elevada. A anóxia anêmica pode levar a um metabolismo anaeróbico e acidose metabólica. Devido à hemoglobinemia ocorre uma hemoglobinúria. Depósito de pigmento de ferro, aliado à anóxia tissular, podem levar a nefropatias (BREITSCHWERDT, 1993; HILDEBRANDT, 1981; LOBETTI; REYERS, 1996). A lesão renal pode ser mais acentuada em animais velhos (HARAPIN *et al*, 1993). Sabe-se que diversas citocinas desempenham papel importante na patogenia da babesiose (GALE *et al*, 1998; HANAFUSA *et al*, 1998).

6. SINAIS CLÍNICOS

A gravidade das manifestações clínicas está associada à patogenicidade da cepa de *Babesia*, intensidade da parasitemia, resposta imune e idade do hospedeiro (MARTINOD; LAURENT; MOREAU, 1986). As manifestações variam de doença subclínica até doença hiperaguda, sendo que cães jovens são mais sensíveis e freqüentemente apresentam formas mais grave da doença (BREITSCHWERDT, 1993). A forma hiperaguda

ocorre em cães muito jovens, com idade inferior a quatro semanas. Nessa forma é comum ocorrer anemia intensa, hemoglobinúria, icterícia, hipotermia e choque. Também podem aparecer sinais neurológicos, como incoordenação motora e convulsões (ABDULLAHI *et al*; 1990). A fase aguda da infecção, comum em animais com idade inferior a um ano, caracteriza-se por perda de apetite, depressão, febre, mucosas pálidas e icterícia (ABDULLAHI *et al*, 1990; BREITSCHWERDT *et al*, 1983; LOBETTI, 1995). Também são descritas linfadenopatias e esplenomegalia moderada. Nos casos mais graves, pode ocorrer hemoglobinúria. Na forma crônica ocorre febre intermitente, anorexia, emaciação, fraqueza, esplenomegalia e mais raramente, hemoglobinúria e icterícia (BREITSCHWERDT, 1993). Casos complicados de babesiose canina podem levar à acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada (CID). Outra complicação observada em alguns animais acometidos pelo protozoário é a pancreatite aguda (MOHR; LOBETTI; VAN DER LUGT, 2000). Muitos cães que se infectam apresentam sinais brandos como apatia e febre, recuperam-se rapidamente e tornam-se portadores do parasita. Essa é uma característica de forma subclínica, sendo muito comuns em cães de áreas endêmicas. Entretanto, animais portadores podem adoecer quando são submetidos a stress intenso como, por exemplo, doenças concomitantes (BREITSCHWERDT, 1993).

Cães com infecções subclínicas são comuns em certas populações. Os parasitas são raramente encontrados no sangue periférico de doentes assintomáticos, dificultando a identificação desses grupos de cães sem o teste sorológico. Estes cães são importantes pelo potencial em infectar carrapatos, mantendo a doença no ambiente. A prevalência de anticorpos contra *B. canis* em cães no Brasil varia de 20% a 48% de acordo com a população estudada (BASTOS *et al*, 2004; BRACCINI *et al*, 1992; DANTAS-TORRES *et al*, 2004; DELL'PORTO *et al*, 1993; GUIMARÃES *et al*, 2004; TRAPP *et al*, 2006).

Quanto aos achados laboratoriais o mais comum é anemia hemolítica, do tipo regenerativa, com presença de reticulócitos, anisocitose e policromasia (ABDULLAHI *et al*, 1990, BREITSCHWERDT *et al*, 1983, LOBETTI, 1996). Em relação às alterações leucocitárias, alguns autores descrevem a ocorrência de leucocitose, enquanto outros descrevem a ocorrência de leucopenia (TABOADA, 1998). Em animais com doença hiperaguda foi observado leucocitose neutrofílica (ABDULLAHI, *et al*, 1990). Entretanto, no Brasil, cães esplenectomizados que vieram a óbito em decorrência de babesiose, apresentaram leucopenia devido à neutropenia e linfopenia. Já em animais que sobreviveram à infecção, foram observados neutropenia discreta e linfocitose (KAGIWARA; HOLZCHUH, 1987). Lobetti (1996) descreveu um caso em que cães infectados apresentaram resposta leucemóide, com leucocitose elevada, neutrofilia com desvio a esquerda e presença de metamielócitos circulantes. Trombocitose é um achado freqüente na babesiose canina (BREITSCHWERDT, *et al*, 1983, KAGIWARA; YAMAGA, 1987, LOBETTI, 1996), porém, na maioria das vezes é branda, não sendo suficiente para desencadear fenômenos hemorrágicos (KAGIWARA; YAMAGA, 1987).

7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Babesiose é baseado no exame físico, na história clínica, na visualização do organismo dentro das hemáceas em esfregaço de sangue periférico corado pelo Giemsa (GUIMARÃES *et al*, 2002), na detecção de anticorpos circulantes por imunofluorescência ou de fragmentos de DNA pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). O sangue para esfregaço deve ser coletado das pontas das orelhas ou caudas, pois aumenta a sensibilidade do teste, já que é um teste de baixa sensibilidade e alta especificidade. Durante a fase crônica da doença, o cão apresenta baixa parasitemia podendo ocorrer resultados falso negativo (GUIMARÃES *et al*, 2002).

Os testes sorológicos são úteis para identificar pacientes assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia geralmente está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico. Porém, a validade diagnóstica dos testes sorológicos é ruim na falta de sinais clínicos e informações do paciente. A imunofluorescência indireta e ELISA são consideradas testes com alta sensibilidade e moderada especificidade para detecção de anticorpos contra *Babesia* em cães (DELL'PORTO *et al*, 1993; YAMANE *et al*, 1993; FURUTA, *et al*, 2004).

Os testes moleculares, especialmente a PCR, é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias (GASSER, 2006). A PCR mostrou-se útil na detecção do DNA da *Babesia* no sangue de cães (BIRKENHEUER *et al*, 2003; INOKUMA *et al*, 2005), com especificidade e sensibilidade de 100% (MARTIN *et al*, 2006). A desvantagem da PCR é o requerimento de equipamentos laboratoriais especializados e pessoas bem treinadas.

O diagnóstico para infecção por *B. gibsoni* pode ser feito pelo exame microscópio do esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. Entretanto, esse método requer experiência porque os parasitas não são visualizados quando a parasitemia é baixa. O diagnóstico sorológico pode ser usado, mas alguns problemas com especificidade como a reação cruzada com a *B. canis* pode acontecer e ocorrer resultados negativos em pacientes com estágio inicial da infecção (FUKUMOTO *et al*, 2001).

8. TRATAMENTO

O dipropionato de imidocarb, administrado na dose de 5 mg/kg, SC, e repetido em 14 dias, é altamente eficaz em cães com babesiose em cães e com infecções mistas com *Ehrlichia canis* (LAPPIN; 2006). O aceturato de diaminazeno pode ser usado na dose de 3,5mg/kg, SC, em dose única, sendo eficaz nas infecções principalmente de filhotes, onde a dipropionato de Imidocarb é contra indicado, porém não possui efeito contra a *E. canis*

(TABOADA, 1998). A doxiciclina na dose de até 10mg/kg, VO, BID pode ser eficaz no controle da babesiose (TABOADA, 1998). Consta que o isotianato de fenamidina é eficaz para diminuir a doença clínica associada a infecções por *Babesia* spp., quando administrado na dose de 15 mg/kg em uma solução 5%, por via subcutânea, uma vez ao dia por dois dias (LAPPIN, 2006). O metronidazol administrado (25 mg/kg, VO, BID/TID) durante 2 a 3 semanas ou o hidrocloreto de clindamicina administrado (12,5 mg/kg, VO, BID) por 2 a 3 semanas podem diminuir a doença clínica, se outros fármacos não estiverem disponíveis (LAPPIN, 2006). A terapia de suporte (sangue ou seus derivados, fluidos, etc.) deve ser instituída sempre que necessário. O controle de carrapato é fundamental na prevenção da babesiose (LAPPIN, 2006).

9. REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, S.U.; MOHAMMED, A.R.; TRIMNEL, A.; SANNUSI, A.; ALAFIATAYO, R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.31, p. 145-147, 1990.

BASTOS, C.V.; MOREIRA, S.M.; PASSOS, L.M.F. Restrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1026, p. 158 – 160, 2004.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asia genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.9, p. 4172 – 4177, 2003.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.124, p. 151 – 160, 2004.

BRACCINI, G.L.; CHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil 1986 – 1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinaria, UFRGS**, Porto Alegre, v.20, p. 134 – 149, 1992.

BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: GREENE, R.T. **Enfermedades Infecciosas de los Perros y Gatos**. Mexico: Interamericana, p. 834 – 841, 1993.

BREITSCHWERDT, E.B.; MALONE, J.B.; MACWILLIAMS, P.; LEVY, M.G.; QUALLS, C.W.; PRUDICH, M.J. Babesiosis in Grayhound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.182, p. 978 – 982, 1983.

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. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.46, p. 298 – 303, 1999.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasiting humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 64 – 67, 2004.

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from de city of São Paulo: Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.2, p. 37 – 40, 1993.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.63, n.9, p. 977 – 981, 2001.

FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 35, p. 1031 – 1035, 2005.

FURUTA, P.I.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROCHA, A.G.; TINUCCI-COSTA, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13 (suplem. 1), p. 231, 2004.

GALE, K.R.; WALTISBUHL, D.J.; BOWDEN, J.M.; JORGENSEN, W.K.; MATHESON, J.; EAST, I.J.; ZAKRZEWSKI, H.; LEATCH, G. Amelioration of virulent babesia bovis infection in calves by administration of the nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 20, p. 441 – 445, 1998.

GASSER, R.B. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 69 – 89, 2006.

GUIMARÃES, A.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; SANTA-ROSA, I.C.A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v.41, p. 60 – 68, 2002.

GUIMARÃES, J.C.; ALBERNAZ, A.P.; MACHADO, J.A.; JUNIOR, O.A.M.; GARCIA, L.N.N. Aspectos clínicos-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13(suplem.1), p. 229. 2004.

HANAFUSA, Y.; CHO, K.O.; KANEMARU, T.; WADA, R.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. **Journal of the Veterinary Science**, Suwon, v.60, p.1127 – 1132, 1998.

HARAPIN, I.; RAMADAN, P.; BEDRICA, L.; TADIC, M.; ALEGRO, A. Clinical Picture and the Blood Urea Nitrogen (BUN) and creatinine content in the blood serum of piroplasmosis-affected dogs. **Veterinarski arhiv**, Zagreb, v.63, p. 11 – 17, 1993.

HILDEBRANDT, P.K. The organ and vascular pathology of babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. Babesiosis. **Academic Press**, New York, p. 449 – 474. 1981.

INOKUMA, H.; OKADA, M.; YOSHIZAKI, Y.; HIRAOKA, H.; MIYAMA, T.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Clinical observation of *Babesia gibsoni* infection with low parasitaemia confirmed by PCR in dogs. **Veterinary Record**, London, v.156, p. 116 – 118, 2005.

KAGIWARA, M.K.; HOLZCHUH, M.P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*. I- Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.39, p. 745 – 755, 1987.

KAGIWARA, M.K.; YAMAGA, A. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*. II- Estudo das alterações da coagulação sanguínea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.39, p.757 – 770, 1987.

KJEMTRUP, A.M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B.L.; CARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia*, identified in California. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.138, p. 103 – 111, 2006.

LAPPIN, M.R. Doenças Infecciosas. In: **NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ª Ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2006.

LOBETTI, R.G. Leukaemoid response in two dogs with *Babesia canis*. **Journal of South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v.66, p. 182 – 184, 1995

LOBETTI, R.G.; REYERS, F. Methaemoglobiburia in naturally occurring *Babesia canis* infection. **Journal of South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v.67, p. 88 – 90, 1996.

LOBETTI, R.G. Canine Babesiosis. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton 20: p. 418-30.1998.

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in na endemic area. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.19, p. 245 – 254, 1986.

MARTIN, A.R.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K.; BROWN, G.K. *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.112, p. 63 – 65, 2006.

MATSUU, A.; KAWABE, A.; KOSHIDA, Y.; IKADAI, H.; OKANO, S.; HIGUSHI, S. Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.88, n.8, p. 893 – 897, 2004.

MELHORN, H.; SCHEIN, E.; VOIGT, W.P. Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.66, p. 220 – 228, 1980.

MOHR, A.J.; LOBETTI, R.G.; VAN DER LUGT, J.J. Acute pancreatitis: a newly recognised potential complication of canine babesiosis. **Journal of South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v.71, p. 232 – 239, 2000.

OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H.A.S. Caracterização dos carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, p. 87 – 90. 2002.

O'DWYER, L.H. Aspectos biológicos do desenvolvimento e da transmissão de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) pelo *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) no Brasil. **Dissertação (Mestrado)** – Unuversidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 69p, 1996.

O'DYWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; DAEMON, E. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) nos ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.19, p. 58 – 61, 1997a.

O'DYWER, L.H.; MASSARD, C.L.; DAEMON, E. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) nos ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.6, p. 11 – 14, 1997b.

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

SCHEIN, E.; MELHORN, H.; VOIGT, W. Eletron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. **Acta Tropica**, Basel, v.36, p. 229 – 241, 1979.

SHORTT, H.E. Life story and morphology of *Babesia canis* in the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.23, p. 885 – 920, 1936.

SHORTT, H.E. *Babesia canis*: the life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal of Parasitology**, Oxford, 3: 119 – 148, 1973.

TABOADA, J. Babesiosis. In: **GREENE, C.E. Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2^a ed. Philadelphia: Saunders, p.473-81, 1998.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Soroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.140, p. 223 – 230, 2006a.

TRAPP, S.M.; MESSICK, J.B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S.; MORAIS, H.S.A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 177 – 180, 2006b.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M.; SPANJER, A.A.M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.11, p. 33 – 40, 1989.

YAMANE, I.; THOMFORD, J.W.; GARDNER, I.A.; DUBEY, J.P.; LEVY, M.; CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, p. 1579 – 1584, 1993.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.87, p. 544 – 548, 1998.

II. OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a infecção por espécies de *Babesia* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Detectar a presença de *Babesia* sp em sangue de animais com anemia, leucopenia e trombocitopenia, através da utilização da técnica da PCR.

Verificar a ocorrência das espécies de *Babesia* presentes nesses animais através da utilização da análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição *Hinf I*.

Caracterizar molecularmente as espécies de *Babesia* nessa população hospitalar.

III. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Ocorrência e caracterização molecular das espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, Paraná.

Jojima, Flavio Shigueru¹; Garcia, João Luís²; Vidotto, Marilda Carlos³; Fabretti, Andrei Kelliton⁴; Vidotto, Odilon⁵

¹Professor auxiliar do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Avançado de Umuarama

²Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

³Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

⁴Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina

⁵Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A Babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Babesia*. *Babesia canis* e *B. gibsoni* são as duas espécies que causam infecção natural em cães. O objetivo do trabalho foi avaliar a infecção por espécies de *Babesia* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL). Foram selecionados 282 cães atendidos no HV-UEL no período de abril de 2005 a maio de 2006 que apresentavam anemia (VG < 25%), trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150.000/mm³), leucopenia (contagem de leucócitos totais < 5.000/mm³) ou uma combinação de duas ou três dessas alterações no momento da consulta. A presença de *Babesia* sp foi confirmada através da detecção do material genômico do gênero *Babesia* pela PCR. No exame microscópico de esfregaços de sangue corados pelo Giemsa foram detectadas 38 (13,5%) amostras positivas contra 105 identificadas pela PCR do total de 282 amostras examinadas. As amostras positivas foram submetidas à PCR-RFLP com a *Hinf I*, que possibilita a diferenciação das espécies de *B. canis vogeli* e *B. gibsoni*. A infecção por *Babesia* sp foi identificada em 105 (37,2%) cães de um total de 282. Destas 105 amostras positivas, a PCR-RFLP identificou 66 amostras (62,8%) com perfil de clivagem compatível com a *B. canis vogeli* e 39 (37,2%) com a *B. gibsoni*. Como conclusões, os resultados obtidos permitem afirmar que a babesiose é um importante diferencial para animais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia; A *B. canis vogeli* é a subespécie que está presente na maioria dos casos de babesiose na população de cães estudada e a *B. gibsoni* também está presente causando babesiose, em cães da região de Londrina, Paraná.

Palavras-chave: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, cães, anemia, leucopenia, trombocitopenia, PCR.

Occurrence and molecular characterization of *Babesia* species in a canine hospital population in Londrina region, Parana State, South Brazil.

Jojima, Flavio Shigueru¹; Garcia, João Luís²; Vidotto, Marilda Carlos³; Fabretti, Andrei Kelliton⁴; Vidotto, Odilon²

¹Professor auxiliar do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Avançado de Umuarama

²Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

³Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

⁴Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina

⁵Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Canine babesiosis is a worldwide disease caused by the protozoan of *Babesia* genus. *Babesia canis* and *B. gibsoni* are both species that naturally infect dogs. The objective of this study was to evaluate the infection of *Babesia* species in dogs attended at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL). It was selected 282 dogs seen at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL) between April of 2005 and May of 2006. They presented anemia (Packed Cell Volume <25%), thrombocytopenia (Platelet count <150000/mm³), leukopenia (White blood cell count <5000/mm³) or a combination of two or three of these alterations at the moment of the consultation. The presence of *Babesia sp.* was determined by the detection of genomic material of *Babesia* genus by PCR. The presence of *Babesia sp* was determined by the amplification of a specific fragment of DNA of the *Babesia* genus by PCR. Microscopic examination of Giemsa-stained blood smears detected 38 (13.5%) positive samples against 105 identified by PCR from 282 dogs. It shows that PCR is more sensible than microscopic examination of Giemsa-stained blood smears. The positive samples were submitted to PCR-RFLP by *Hinf* I that allows distinguishing the species of *B. canis vogeli* and *B. gibsoni*. In 282 dogs, the infection of *Babesia sp* was identified in 105 (37.2%). From these 105 positive samples, the PCR-RFLP identified 66 (62.8%) samples with a profile compatible to *B. canis vogeli* and 39 (37.2%) to *B. gibsoni*. As conclusions, the results obtained allow to affirm that the babesiose is an important differential for dogs that present anemia, leukopenia and thrombocytopenia and, *B. canis vogeli* is the subspecies that is present in the most of the cases of babesiose in the population of dogs studied and, that *B. gibsoni* is also present causing babesiosis in dogs of the Londrina region, Parana State, Brazil.

Key-words: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, dogs, anemia, leukopenia, thrombocytopenia, PCR.

INTRODUÇÃO

A Babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Babesia*. *Babesia canis* e *B. gibsoni* são as duas espécies que causam infecção natural em cães (TABOADA, 1998).

Três subespécies de *B. canis* são reconhecidas, em função do vetor, da patogenicidade e localização geográfica: *B. canis canis*, transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*, está presente na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, ocorre nas regiões tropical e subtropical; e *B. canis rossi*, transmitida pelo *Haemaphysalis leachi* descrita na África do Sul (UILENBERG *et al*, 1989; LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998). A existência destes três genogrupos foi comprovada por estudos genéticos (CARRET *et al*, 1999; ZAHLER *et al*, 1998). A cepa da África do Sul, transmitida pelo *H. leachi*, é considerada a mais patogênica.

Recentemente, foi identificada uma nova espécie de *Babesia* parasitando cães na Califórnia, USA. Trata-se de uma pequena babesia que apresenta características parecidas com a *Babesia microti* e a *Theileria* spp. A nova espécie foi denominada de *B. conradae* (KJEMTRUP *et al*; 2006). Acredita-se que esta nova espécie seja transmitida pelo *R. sanguineus*, pela via transtadial (KJEMTRUP *et al*; 2006). Outra espécie de *Babesia* foi caracterizada na Carolina do Norte, EUA, causando doença em um cão. O animal apresentava anemia, trombocitopenia e leucopenia. Trata-se de uma grande babesia que na caracterização genética apresentou homologia de 93,9% com a seqüência da *B. bigemina* e 93,5% com a *B. caballi*. Quando comparada à *B. canis vogeli*, *B. canis canis* e *B. canis rossi*, o isolado apresentou apenas 91,2 – 91,6% de homologia. Esse espécie ainda não foi nomeada (BIRKENHEUER *et al*; 2004).

Estudos realizados com isolados brasileiros de babesias de cães mostram que no Brasil a babesiose canina é causada predominantemente pela *B. canis vogeli*, com relatos de ocorrência de *B. gibsoni* no sul do país (PASSOS *et al*, 2005; TRAPP *et al*, 2006).

Passos *et al* (2005) realizaram PCR em cinco cães positivos para *Babesia* no esfregaço sanguíneo. O seqüenciamento desses produtos obtidos na PCR mostrou que as amostras apresentavam 100% de compatibilidade entre si. A comparação com outras seqüência de *B. canis vogeli* disponíveis no *GenBank* demonstrou que as amostras apresentavam similaridade de 100% com a cepa do Japão, 99,4% com cepas da Austrália, Estados Unidos, França, Espanha, Egito 2 e África do Sul. Em relação à cepa Egito 1 verificou-se uma diferença em apenas 2 pares de bases indicando que a subespécie que provavelmente está envolvida nos casos de Babesiose no Brasil é a *B. canis vogeli*.

A *B. gibsoni* foi identificada em quatro de 16 amostras de sangue de cães parasitados utilizando a PCR em isolados de casos clínicos em Londrina, Paraná. As amostras apresentavam inclusões intra-eritrocitárias e todas eram soronegativas para *B. canis* pela IFI. As amostras positivas para *B. gibsoni* apresentaram uma homologia de 99% com a *B. gibsoni* Ásia1. Dois cães positivos apresentaram coinfeção com *Ehrlichia canis* e dois com *Micoplasma haemocanis* (TRAPP *et al*; 2006b). O *Rhipicephalus sanguineus* pode ser o principal transmissor da *B. gibsoni*, já que 96% dos carrapatos coletados de cães desta região eram *R. sanguineus* (OYAFUSO *et al*; 2002; TRAPP *et al* 2006a).

O diagnóstico da Babesiose é baseado no exame físico, na história clínica, na visualização do organismo dentro das hemáceas em esfregaço de sangue periférico corado pelo Giemsa (GUIMARÃES *et al*, 2002), na detecção de anticorpos circulantes por imunofluorescência ou de fragmentos de DNA pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). O sangue para esfregaço deve ser coletado das pontas das orelhas ou caudas, pois aumenta a sensibilidade do teste, já que é um teste de baixa sensibilidade e alta especificidade (GUIMARÃES *et al*, 2002). Durante a fase crônica da doença, o cão apresenta baixa parasitemia podendo ocorrer resultados falso negativo.

Os testes sorológicos são úteis para identificar pacientes assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia geralmente está baixo ou não

detectável no esfregaço de sangue periférico. Porém, a validade diagnóstica dos testes sorológicos é limitada na falta de sinais clínicos e informações do paciente. A IFI e o ELISA são considerados testes com alta sensibilidade e moderada especificidade para detecção de anticorpos contra *Babesia* em cães (DELL'PORTO *et al*, 1993; YAMANE *et al*, 1993; FURUTA, *et al*, 2004).

Os testes moleculares, especialmente à PCR, é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias (GASSER, 2006). A PCR mostrou-se útil na detecção do DNA da *Babesia* no sangue de cães (BIRKENHEUER *et al*, 2003; INOKUMA *et al*, 2005), com especificidade e sensibilidade de 100% (MARTIN *et al*, 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de espécies de *Babesia* e caracterizar molecularmente espécies de *Babesia* infectando cães com quadro de anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS:

População de cães:

Foram selecionados 282 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de abril de 2005 a maio de 2006 que apresentavam anemia ($VG < 25\%$), trombocitopenia (contagem de plaquetas $< 150.000/mm^3$), leucopenia (contagem de leucócitos totais $< 5.000/mm^3$) ou uma combinação de duas ou três dessas alterações no momento da consulta. O tamanho da amostra foi calculado através do programa Epi-Info 6,04b, tendo como universo 1300 cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL com as alterações mencionadas acima durante o ano de 2004, utilizando uma prevalência de 21,7% (DAGNONE *et al*, 2003), com estimativa de precisão de 5%, e nível de significância de 95%.

Colheita das amostras

Foram coletados assepticamente de cada cão 5 ml de sangue da veia jugular, tendo o EDTA como anticoagulante. Uma parte de cada amostra foi alíquotada em tubos tipo Eppendorf estéreis e mantidas a -20 °C para o uso nos experimentos com a PCR. A outra parte foi utilizada para a confecção de esfregaços sanguíneos e hemograma.

Hemograma

Os hemogramas foram realizados em um contador hematológico de células totalmente automático da marca MS4[®], que fornece todos os dados do exame, exceto, o exame diferencial de leucócitos e a contagem de plaquetas que foram conferidos na lâmina com esfregaço sanguíneo.

Esfregaço sanguíneo

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados com uma gota de sangue obtida do frasco de coleta com EDTA e corados com Giemsa. A leitura foi realizada pela contagem de 20 campos na lâmina tentando visualizar os merozoítos da *Babesia spp.*

Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de uma alíquota de 200 µl de sangue com EDTA congelado (-20°C), utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen[™]), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi colocado em tubos de polipropileno de 1,5ml estéreis, identificados e armazenados a -20°C, para utilização na PCR.

PCR para o gênero *Babesia*

A técnica de PCR utilizada foi descrita por Trapp *et al* (2006b). A amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, com uma mistura contendo 7,0µL de amostra de DNA, 200µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*): Piro F (5' – AGT CAT ATG CTT GTC TCA – 3') e Piro R (5' – CCA-TCA-TTC-CAA-TTA-CAA – 3'), 1,25U de Taq DNA polimerase e água ultra pura estéril q.s.p 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram: desnaturação inicial de DNA a 95°C/5 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 50°C/1 min, extensão a 72 °C/1 min, e uma extensão final a 72 °C/10 min. A amplificação foi realizada no termociclador modelo PTC-100™ - Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc.).

Teste de Sensibilidade da PCR

O teste de sensibilidade foi realizado a partir de uma amostra de sangue com 13% de parasitemia. Foi realizada a extração do DNA e PCR dessa amostra. Foi colocado em cada eppendorff 200µl de água pura estéril. Pipetou-se 20µl da amostra amplificada pela PCR no primeiro eppendorff. Após homogeneização foi coletado 20µl dessa solução e passado no próximo eppendorff até o ultimo, completando-se 10 diluições na base 10, até 10⁻¹⁰. Foram desprezados os 20µl retirados do ultimo eppendorff. O material de cada diluição foi submetido ao gel de agarose a 2,0% para visualização da banda de peso molecular conhecida.

Análise do produto amplificado

O produto amplificado na PCR foi visualizado em Gel de Agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5µL/mL) submetido à eletroforese em cuba horizontal com fonte de 100V/50mA. A leitura foi realizada após aproximadamente uma hora de corrida, em transluminador de luz ultra-violeta, com posterior documentação fotográfica utilizando-se de uma câmera digital (KODAK ® DC 290). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produto amplificado de aproximadamente 460 pares de base (pb).

PCR-RFLP

As amostras positivas na PCR para o gênero *Babesia* sp foram submetidas à PCR-RFLP com a *Hinf I* para a caracterização das espécies envolvidas. O padrão de clivagem foi realizada utilizando as sequencias disponíveis no GenBank para a *B. canis vogeli* (AY371196) e para a *B. gibsoni* (AY278443). Foram utilizados, 10µl de cada amostras amplificada na PCR, 2U da enzima *Hinf I*, 2,0µl de tampão REact 2 e água pura estéril q.s.p 15µl. A mistura foi colocada em banho-maria à 37 °C por no mínimo 4 horas. Após esse tempo, foram colocadas em banho-maria à 65 °C por 20 minutos para interrupção da reação de clivagem. A *Hinf I* cliva o produto da PCR em fragmentos específicos: *B. canis* - bandas com 135, 102, 100, 94 e 20 pares de bases e *B. gibsoni* - bandas com 238, 204 e 18 pares de bases.

Seqüenciamento do material amplificado

As amostras foram submetidas à purificação e ao seqüenciamento do DNA para a caracterização das espécies de *Babesia*. A purificação do DNA foi realizada pelo Serviço de Purificação de Produtos de DNA e o seqüenciamento pelo Serviço de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

Análise Estatística:

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o método de qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, com $\alpha=5\%$ e intervalo de confiança de 95% e o coeficiente de Kappa (κ) para verificar a concordância entre as técnicas diagnósticas. Esta análise estatística foi realizada através do programa Epi-Info 3.3.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR realizada com os *primers* do gênero *Babesia* amplificou uma banda com tamanho molecular aproximado de 460 pb em 105 (37,2%) amostras de sangue de cães de um total de 282 (Figura 1). Enquanto que pelo exame microscópico foram detectadas 38 (13,5%) amostras positivas (Tabela 1). Apresentou $\chi^2=70,96$ e $p<0,05$, mostrando que há associação entre as técnicas. A comparação dos esfregaços corados por Giemsa e a PCR apresentaram kappa moderado ($\kappa=0,41$), sensibilidade de 36,2%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 72,54% e eficácia de 76,24%. Isso mostra que a PCR é mais sensível que o exame microscópico de esfregaço corado pelo Giemsa, que por sua vez é extremamente específico.

Todas as amostras positivas na PCR foram submetidas à RFLP, obtendo-se 66 (62,8%) com perfil compatível com a subespécie *B. canis vogeli* e 39 (37,2%) com a espécie *B. gibsoni* (Figura 3). Esses resultados sugerem que a *B. gibsoni* também pode estar envolvida em casos clínicos de babesiose canina no Brasil, como já havia sido relatado anteriormente por Gothe e Wegerdt (1991) e mais recentemente por Trapp *et al* (2006b).

O resultado de 37,3% de positividade para *Babesia* sp é semelhante ao encontrado em um trabalho realizado em cães do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, no qual foi demonstrada uma soroprevalência de 35,7% (TRAPP, *et al*; 2006a), porém superior ao encontrado em Minas Gerais, que foi de 18,8% (MAIA *et al*, in press) e inferior em relação a encontrada em São Paulo, que foi de 42,4% (DELL'PORTO *et al*, 1993).

Dos 105 animais positivos na PCR, 57 (54,3%) apresentaram anemia, 37 (35,2%) leucopenia, e 61 (58,6%) trombocitopenia (Tabela 3) ($\chi^2=2,04$, $p=0,56$). Considerando as associações clínicas, 17 (16,2%) apresentaram anemia e trombocitopenia, cinco (4,8%) anemia e leucopenia, seis (5,7%) leucopenia e trombocitopenia e 11 (10,5%)

apresentaram anemia, leucopenia e trombocitopenia (Tabela 3). Não houve diferenças estatísticas significativas ($p>0,5$).

Em relação às espécies de *Babesia*, as alterações mais evidentes foram anemia e trombocitopenia (Tabela 3). Em relação às espécies, a *B. canis vogeli* teve a anemia e trombocitopenia como alterações mais frequentes. Esses sinais foram compatíveis aos encontrados na Eslovênia onde foi encontrada uma prevalência de 5,9% (DUH *et al*, 2004) e no Japão onde 6,3% foram positivos para *B. canis* (INOKUMA *et al*, 2004), porém com índice alto de leucopenia o que não foi encontrado nesses trabalhos. Enquanto que para a *B. gibsoni*, somente a anemia e a trombocitopenia foram os achados mais consistentes. Contudo, o cálculo do teste de χ^2 mostrou que não houve diferença significativa, não havendo associação entre os critérios de inclusão e os resultados da PCR e PCR-RFLP ($\chi^2=11,77$ e $p=0,06$ e $\chi^2=4,86$ e $p=0,56$, respectivamente).

Nas amostras amplificadas para o gênero *Babesia*, observou-se que os machos foram os mais acometidos, sendo amplificado em 62 animais (22,0%). Nas fêmeas foi visualizada a banda de peso molecular de 460 pb em 43 (15,2%) das amostras. Isso também foi demonstrado quando foi realizada a clivagem com enzima de restrição para diferenciação das espécies. O perfil de clivagem para *B. canis vogeli* foi constatado em 36 (34,3%) machos e 30 (28,6%) fêmeas. Em relação à *B. gibsoni*, visualizou-se o perfil de clivagem em 26 (24,8%) machos e 13 (12,4%) fêmeas (Tabela 4). Esses resultados podem ser explicados, já que os cães machos possuem a tendência de sair mais a rua e conseqüentemente se infestarem facilmente por carrapatos. Existe o fato dos machos serem mais territorialistas e se envolverem mais em brigas, quando podem se infectar com a *B. gibsoni*. Este fato foi evidenciado por Matsuu *et al* (2004) constatando que 41 (47,1%) de 87 animais que tinham se envolvido em brigas, eram positivos para *B. gibsoni* e nessa amostragem 85 cães eram machos. Entretanto, esse tipo de transmissão em relação ao envolvimento com brigas ainda não foi pesquisado no Brasil. Em relação ao sexo dos animais, não houve diferença

significativa, mostrando que o sexo não influenciou nos resultados da PCR ($\chi^2=1,06$, $p=0,30$) e da PCR-RFLP ($\chi^2=1,03$, $p=0,31$).

Os cães sem raça definida (SRD) foram os animais mais acometidos pelo gênero *Babesia* nesse estudo, verificando que 43 animais foram positivos, seguido pelo Pastor Alemão, com 11 acometidos e o Poodle com 10. Em todas as raças houve um maior número de animais que apresentou perfil enzimático semelhante à *B. canis vogeli* se comparado ao *B. gibsoni*, com exceção do Pastor Alemão que possui mais casos positivos para *B. gibsoni* (Tabela 5). A raça não influenciou nos resultados da PCR e PCR-RFLP ($\chi^2=1,87$ e $p=0,92$ e $\chi^2=4,45$ e $p=0,48$ respectivamente).

Os animais de um a cinco anos de idade apresentaram maior índice de positividade em relação ao gênero *Babesia*, seguido da faixa de animais com até um ano de idade, de cinco a 10 anos e acima de 10 anos, respectivamente. Entretanto, em relação às espécies estudadas, para *B. canis vogeli*, o maior índice foi com animais com até um ano de idade, compatível com a literatura, onde os animais nessa faixa etária normalmente são os mais acometidos (BREITSCHWERDT, 1993). Entretanto, segundo o cálculo do χ^2 , não houve diferença significativa, concluindo-se que a idade não teve influência no resultado da PCR ($\chi^2=2,04$ e $p=0,56$). O perfil de clivagem para *B. gibsoni* foi observado mais em animais com faixa de idade entre um a cinco anos, diferenciando da *B. canis vogeli*, o que pode ser explicado já que animais nessa faixa de idade estão no auge da reprodução e conseqüentemente mais propensos a brigas (Tabela 6). Neste caso também não houve diferença significativa ($\chi^2=0,92$ e $p=0,82$), portanto, a idade não influenciou no resultado da PCR-RFLP.

Como conclusões, os resultados obtidos permitem afirmar que a babesiose é um importante diferencial para animais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia; a *B. canis vogeli* é a subespécie que está presente na maioria dos casos de

babesiose na população de cães estudada e que a *B. gibsoni* também está presente em cães da região de Londrina.

REFERÊNCIAS

BASTOS, C.V.; MOREIRA, S.M.; PASSOS, L.M.F. Restrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1026, p. 158 – 160, 2004.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asia genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.9, p. 4172 – 4177, 2003.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.124, p. 151 – 160, 2004.

BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: GREENE, R.T. **Enfermidades Infecciosas de los Perros y Gatos**. Mexico: Interamericana, p. 834 – 841, 1993.

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. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.46, p. 298 – 303, 1999.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A. de; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.117, p.285-290, 2003.

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from de city of São Paulo: Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.2, p. 37 – 40, 1993.

DUH, D.; TOZON, N.; PETROVEC, M.; STRASEK, K.; AVSIC-ZUPANC, T. Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.35, p. 363 – 368, 2004.

FURUTA, P.I.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROCHA, A.G.; TINUCCI-COSTA, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13 (suplem. 1), p. 231, 2004.

GASSER, R.B. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 69 – 89, 2006.

GOTHE, R.; WEGERDT, S. Babesiosis of dogs in Germany: epidemiological case analysis. **Tierartzliche Praxis 19**: p.170-3, 1991.

GUIMARÃES, A.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; SANTA-ROSA, I.C.A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v.41, p. 60 – 68, 2002.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.121, p. 341 – 346, 2004.

INOKUMA, H.; OKADA, M.; YOSHIZAKI, Y.; HIRAOKA, H.; MIYAMA, T.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Clinical observation of *Babesia gibsoni* infection with low parasitaemia confirmed by PCR in dogs. **Veterinary Record**, London, v.156, p. 116 – 118, 2005.

KJEMTRUP, A.M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B.L.; CARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia*, identified in California. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.138, p. 103 – 111, 2006.

LOBETTI, R.G. Canine Babesiosis. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton 20: p. 418-30.1998.

MAIA, M.G.; COSTA, R.T.; HADDAD, J.P.A.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid área of the state of Minas Gerais, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, 2007 (in press).

MARTIN, A.R.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K.; BROWN, G.K. *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.112, p. 63 – 65, 2006.

MATSUU, A.; KAWABE, A.; KOSHIDA, Y.; IKADAI, H.; OKANO, S.; HIGUSHI, S. Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.88, n.8, p. 893 – 897, 2004.

OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H.A.S. Caracterização dos carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, p. 87 – 90. 2002.

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

TABOADA, J. Babesiosis. In: **GREENE, C.E. Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2^a ed. Philadelphia: Saunders, p.473-81, 1998.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.140, p. 223 – 230, 2006a.

TRAPP, S.M.; MESSICK, J.B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S.; MORAIS, H.S.A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 177 – 180, 2006b.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M.; SPANJER, A.A.M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.11, p. 33 – 40, 1989.

YAMANE, I.; THOMFORD, J.W.; GARDNER, I.A.; DUBEY, J.P.; LEVY, M.; CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, p. 1579 – 1584, 1993.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.87, p. 544 – 548, 1998.

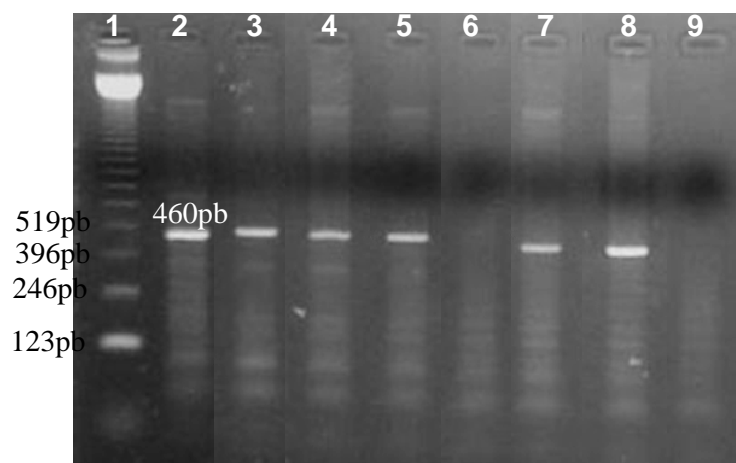


Figura 1. Gel de agarose corado com Brometo de Etídeo de produtos amplificados para o gênero *Babesia* e com peso molecular de aproximado de 460 pb. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo para *B. canis*, canaletas 3 a 5, 7 e 8: amostras positivas para *B. canis*; canaleta 6: amostra negativa e canaleta 9: água.

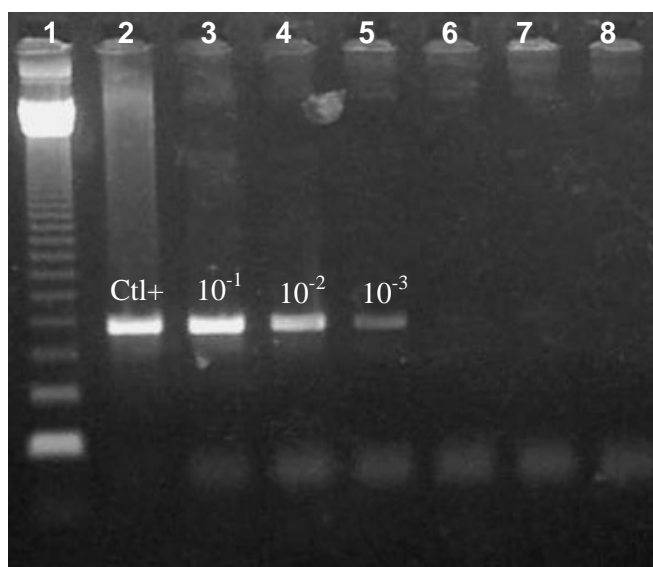


Figura 2. Sensibilidade da PCR. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo com parasitemia de 13% sem diluição, canaletas 3 a 12: diluição de 10^{-1} a 10^{-10} , e canaleta 13: água.

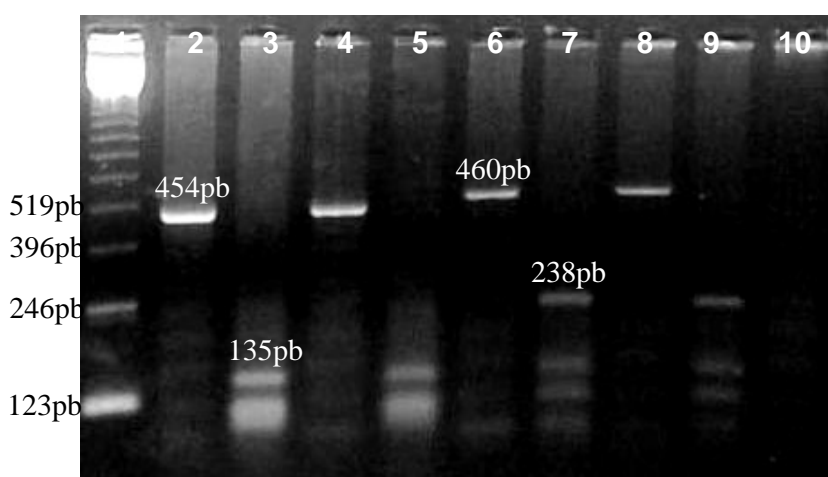


Figura 3. Perfil de clivagem da enzima de restrição *Hinf I* em gel de agarose metaphor a 2% corado com Brometo de Etídeo, demonstrando o perfil de clivagem da enzima de restrição *Hinf I*. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (123), canaleta 2: Controle positivo não clivado, canaleta 3: controle positivo clivado com a enzima de restrição *Hinf I*, com bandas sugestivas de *B. canis vogeli*, canaletas 4 e 5: amostra não clivada e clivada com bandas sugestivas de *B. canis. vogeli*, canaletas 6 a 9: amostras não clivadas e clivadas com a enzima de restrição *Hinf I*, com bandas sugestivas de *B. gibsoni*, e canaleta 10: água.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos pelo Giemsa com a PCR.

Giemsa	PCR	
	Positivo	Negativo
Positivo	38 (13,5%)	0
Negativo	67 (23,8%)	177 (62,8%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)

p<0,05

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos pelo Giemsa com a PCR-RFLP.

Giemsa	Clivagem	
	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Positivo	23 (21,9%)	15 (14,3%)
Negativo	43 (40,9%)	24 (22,9%)
Total	66 (62,8%)	39 (37,2%)

p>0,87

Tabela 3. Resultados obtidos na PCR e na PCR-RFLP segundo os critérios de inclusão.

Critérios de Inclusão	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Anemia	24 (8,5%)	30 (10,6%)	12 (11,4%)	12 (11,4%)
Leucopenia	15 (5,3%)	48 (17,0%)	12 (11,4%)	3 (2,9%)
Trombocitopenia	27 (9,6%)	47 (16,7%)	16 (15,2%)	11 (10,5%)
An + Leuco	5 (1,8%)	2 (0,8%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
An + Trombo	17 (6,0%)	18 (6,4%)	11 (10,5%)	6 (5,7%)
Leuco + Trombo	6 (2,1%)	13 (4,6%)	5 (4,8%)	1 (0,9%)
Ane+ Leuco + Trombo	11 (3,9%)	19 (6,7%)	7 (6,7%)	4 (3,8%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (62,8%)	39 (37,2%)

An = Anemia; Leuco = Leucopenia; Trombo = Trombocitopenia

p>0,5

Tabela 4. Resultados obtidos na PCR e PCR-RFLP levando em consideração o sexo dos animais estudados.

Sexo	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Macho	62 (22,0%)	92 (32,6%)	36 (34,3%)	26 (24,8%)
Fêmea	43 (15,2%)	85 (30,2%)	30 (28,6%)	13 (12,4%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)

p>0,3

Tabela 5. Resultados obtidos na PCR e PCR-RLFP levando em consideração a raça dos animais estudados.

Raça	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Cocker	5 (1,8%)	10 (3,5%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
Pastor Alemão	11 (3,9%)	13 (4,6%)	5 (4,8%)	6 (5,7%)
Poodle	10 (3,5%)	14 (5,0%)	8 (7,6%)	2 (1,9%)
Rottweiler	5 (1,8%)	11 (3,9%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
Sem Raça Definida	43 (15,2%)	76 (27,0%)	30 (28,6%)	13 (12,4%)
Outras Raças	31 (11,0%)	53 (18,8%)	17 (16,2%)	14 (13,3%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)

p>0,4

Tabela 6. Resultados obtidos na PCR e PCR-RLFP levando em consideração a faixa etária dos animais estudados.

Faixa Etária	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Até 1 ano	32 (11,3%)	46 (16,3%)	22 (21,0%)	10 (9,5%)
1 – 5 anos	34 (12,1%)	66 (23,4%)	20 (19,0%)	14 (13,3%)
5 – 10 anos	25 (8,9%)	48 (17,0%)	16 (15,2%)	9 (8,6%)
Acima de 10 anos	14 (5,0%)	17 (6,0%)	8 (7,6%)	6 (5,7%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)

p>0,5

IV. CONCLUSÕES

1. A subespécie *B. canis vogeli* e a espécie *B. gibsoni* estão presentes na população de cães atendida do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina;
2. A ocorrência de babesiose canina utilizando a PCR é semelhante à soroprevalência verificada anteriormente em uma população semelhante estudada;
3. A babesiose é um importante diagnóstico diferencial para animais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia;
4. A técnica de Giemsa mostrou baixa sensibilidade e alta especificidade, enquanto a PCR apresentou sensibilidade e especificidade altas, na detecção de cães parasitados por *Babesia* spp.

V. APÊNDICE

PROTOCOLOS

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES:

1. Tampão AW1 (mantido à temperatura ambiente, 15–25°C)

O Tampão AW1 é estocado concentrado. Antes do uso pela primeira vez, deve adicionar uma quantidade adequada de etanol (96–100%) como é indicado no frasco e na Tabela 7.

O Tampão AW1 é estável por 1 ano quando estocado fechado e a temperatura ambiente.

Tabela 7. Preparação do Tampão AW1.

Kit size	AW1 concentrate (ml)	Ethanol (ml)	Final volume (ml)
50	19	25	44
250	95	125	220

2. Tampão AW2 (estocado a temperatura ambiente, 15–25°C)

O Tampão AW2 é esticado concentrado. Antes do uso pela primeira vez, deve adicionar uma quantidade adequada de etanol (96–100%) como é indicado no frasco e na Tabela 8.

O Tampão AW2 é estável por 1 ano quando estocado fechado e a temperatura ambiente.

Tabela 8. Preparação do Tampão AW2.

Kit size	AW2 concentrate (ml)	Ethanol (ml)	Final volume (ml)
50	13	30	43
250	66	160	226

EXTRAÇÃO DE DNA

1. Pipetar 20 µl QIAGEN Protease (or Proteinase K) dentro do eppendorff de 1.5 ml.
2. Adicionar 200 µl da amostra no eppendorff.
3. Adicionar 200 µl de Tampão AL na amostra. Misture usando o Vortex por 15 s.
4. Incubar à 56°C por 10 min.
5. Centrifugar rapidamente o eppendorff de 1.5 ml para remover gotas dentro da tampa.
6. Adicionar 200 µl etanol (96–100%) na amostra, e misture novamente usando o vortex por 15 s. Após misturar, centrifugue rapidamente o eppendorff de 1.5 ml para remover as gotas de dentro da tampa.
7. Cuidadosamente coloque a mistura do passo 6 no QIAamp Spin Column (em tubo de coleta de 2 ml) sem molhar a borda, fechado a tampa, e centrifugar à 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Coloque o QIAamp Spin Column em um tubo de coleta limpo de 2 ml, e descarte o tubo que contem o filtrado.
8. Cuidadosamente abra o QIAamp Spin Column e adicione 500 µl de Tampão AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue à 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Coloque o QIAamp Spin Column em um tubo de coleta limpo de 2 ml, e descarte o tubo que contem o filtrado.
9. Cuidadosamente abra o QIAamp Spin Column e adicione 500 µl de Tampão AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue em alta velocidade (20,000 x g; 14,000 rpm) por 3 min. Continue diretamente ao passo 10, ou para eliminar qualquer chance de ainda ter o tampão AW2, realize o passo 9a, e logo depois continue com o passo 10.
 - 9a. (Opcional): Coloque o QIAamp Spin Column em um novo tubo coletor de 2 ml (não fornecido) e descarte o tubo coletor com o filtrado. Centrifugue a 20,000 x g (14,000 rpm) por 1 min.

10. Coloque o QIAamp Spin Column em um Eppendorf limpo de 1.5 ml (não fornecido), e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Cuidadosamente abra o QIAamp Spin Column e adicione 200 µl de Tampão AE ou água destilada. Incube a temperatura ambiente (15–25°C) por 1 min, e então centrifugue à 6000 x g (8000 rpm) por 1min.

PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE DA PCR.

1. Preparar 10 eppendorffs devidamente identificados;
2. Adicionar 200µl de água pura estéril em cada Eppendorf;
3. Adicionar no 1º. Eppendorff 20µl da amostra amplificada na PCR;
4. Misturar o conteúdo do 1º. Eppendorff, retirar 20 µl e colocar no próximo eppendorff;
5. Realizar o mesmo procedimento até o 10º. Eppendorff.
6. Despresar os 20 µl retirados do 10º. Eppendorff.

PREPARAÇÃO DO MIX DA PCR à 2,5mM MgCl₂ à 2[].

1. Adicionar 200µl do Tampão;
2. Adicionar 100µl de MgCl₂;
3. Adicionar 4µl de cada dNTPs;
4. Adicionar água pura estéril q.s.p. 1000µl.

PROTOCOLO PARA CLIVAGEM COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hinf I*.

1. Adicionar 10µl de DNA amplificado da amostra;
2. Adicionar 2,0µl do Tampão REact 2;
3. Adicionar 0,25µl da enzima *Hinf I*;
4. Adicionar água pura estéril q.s.p. 15µl;
5. Colocar a mistura em banho-maria à 37°C por pelo menos 4 horas;
6. Interromper a reação colocando a mistura em banho-maria à 65°C por 20 minutos.

PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE À 2,0%.

1. Colocar 1,0g de agarose em recipiente próprio;
2. Adicionar 50ml de TEB 1 [];
3. Pesar e anotar o peso da mistura;
4. Aquecer em microondas até a dissolução completa da agarose;
5. Pesar novamente a mistura e completar com água destilada o conteúdo evaporado;
6. Esfriar a mistura;
7. Adicionar 25µl de Brometo de etídeo;
8. Colocar a mistura em recipiente próprio para formação do gel com as canaletas.

PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE METAPHOR A 2,0%.

1. Colocar 1,0g de agarose metaphor em recipiente próprio;
2. Adicionar 50ml de TEB 1[];
3. Agitar levemente a mistura;
4. Aguardar 10 minutos para que a agarose hidrate;
5. Aquecer a mistura em microondas até iniciar a formação de bolhas de aquecimento;
6. Resfriar a mistura e agitar suavemente;
7. Repetir os passos 3 a 6 até a dissolução completa da agarose;
8. Esfriar a mistura;
9. Adicionar 25 μ l de Brometo de etídeo;
10. Colocar a mistura em recipiente próprio para formação do gel e das canaletas;
11. Antes do uso, o gel deve ser mantido em geladeira por 30 minutos.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.