

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE
ISOLADOS DE *Babesia* EM CÃES DE GOIÂNIA, GO, BRASIL.**

Sabrina Castilho Duarte
Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland C. Linhares

GOIÂNIA
2007

SABRINA CASTILHO DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE
ISOLADOS DE *Babesia* EM CÃES DE GOIÂNIA, GO, BRASIL.**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de mestre em
Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal
de Goiás

Área de concentração:
Sanidade Animal

Orientador:
Prof. Dr. Guido Fontgalland C. Linhares
Comitê de Orientação:
Prof. Dra. Lígia M. F. Borges
Prof. Dr. Percílio Brasil dos Passos

GOIÂNIA
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Duarte, Sabrina Castilho.
D85c Caracterização molecular e morfológica de isolados
de *Babesia* em cães de Goiânia, GO, Brasil / Sabrina
Castilho Duarte. – Goiânia, 2007.
xii,.50f. : il
Orientador: Guido Fontgalland C. Linhares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal
de Goiás, Escola de Veterinária, 2007.

Artigo I. Bibliografia f.43-50.
Inclui listas de abreviaturas, lista de quadros, ta-
belas e figuras.

Artigo II. 1. *Babesia canis vogeli* 2. Reação em
Cadeia da
Artigo III. Polimerase 3. Babesiose canina –
Parasitologia
Artigo IV. 4. Hemoparasitoses 5. *Canis familiares*
I. Linhares,
Artigo V. Guido Fontgalland Coelho. II.
Universidade Federal
Artigo VI. de Goiás, Escola de Veterinária. III.
Título.

CDU
:576.89:636.7

Dedico ao meu marido Alexandre e à
minha filha Beatriz, por serem meu
apoio, meu estímulo e minha alegria.
Em vocês, diariamente, encontro forças
pra recomeçar e transpor as
dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me capacitado a realizar este trabalho. Dele veio toda habilidade, inspiração e todas as oportunidades que fizeram com que este pudesse ser concluído. Muito obrigado Senhor;

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por apoiar o meu aperfeiçoamento profissional, concedendo-me uma bolsa sem a qual não seria possível o meu ingresso no curso de pós graduação;

À compreensão e apoio constantes de minha amada filha Beatriz Castilho Soares, que soube entender os momentos de ausência, soube apoiar meu trabalho e ser minha grande companheira!

Ao meu marido Alexandre S. de Lima, por ser tão solidário e preencher meu coração e minha vida de momentos felizes. Muito obrigada pela colaboração na tradução dos artigos científicos, pela leitura e correções ortográficas dessa dissertação, por estar ao meu lado sempre, me apoiando e entendendo meus momentos de ansiedade;

À minha mãe Marina L. C. Duarte (*in memoriam*) por ter exercido com tanta competência a maternidade. Com ela aprendi a enfrentar as dificuldades que a vida apresentou mesmo na sua ausência. Agradeço aos 12 anos que tive oportunidade de passar ao seu lado e ao amor que até hoje sinto, mesmo após tantos anos sem sua presença;

À minha família amada, meus irmãos queridos, meu pai, minha madrasta por entenderem minha ausência, pelo apoio e pela certeza que tenho um porto seguro em vocês.

Ao meu orientador e amigo Guido F. C Linhares pela dedicação e desprendimento com que ensina; exemplo de competência e humildade. Obrigada por confiar tanto em minha capacidade, certamente mais do que mereço. O seu entusiasmo com o trabalho me contagiava e sempre afastou os momentos de desânimo. Tenho muito orgulho em tê-lo como orientador e muito a agradecer pela oportunidade de ser instruída por um profissional tão gabaritado;

Não poderia deixar de registrar a minha gratidão pela minha co-orientadora Lígia M. F. Borges, que foi muito mais do que isso. Sempre me auxiliou diretamente; acompanhando esse trabalho em todos os momentos; instruindo, amparando e incentivando. Obrigada por tantas conversas esclarecedoras, pela amizade e por se tornar pra mim um exemplo. Sei que levarei comigo muito do que aprendi com ela em todos os momentos da vida;

Tive muita sorte ainda, por ter ao meu lado no desenvolvimento deste trabalho a presença e amizade do Prof. Francisco de Carvalho Dias Filho, um Pai pra mim. Seu estímulo diário foi de grande importância em minha vida. Aprendi muito com ele e sei que torceu muito pelo sucesso deste trabalho. Obrigada.

Tenho muito a agradecer, também, a valiosa e prazerosa colaboração dos alunos: Tatiana Nunes Romanowski e Osvaldo José da Silveira, que se doaram e sempre se mostraram entusiasmados com esse trabalho, vibrando a cada amostra positiva. Foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste estudo. Foi gratificante trabalhar com pessoas tão habilidosas;

Ao Prof. Lívio Martins Costa Júnior (Universidade Federal do Maranhão) por ceder de forma tão solícita e amigável os controles positivos utilizados neste trabalho, o apoio e parceria foram essenciais para o estudo. Agradeço, ainda, a Dr.^a Monika Zahler do Instituto de Parasitologia Comparada e Medicina Tropical da Universidade Ludwig Maximilian – Alemanha, que cedeu ao Prof. Lívio os referidos controles.

Agradeço ao Hospital Veterinário da Escola de Veterinária desta Universidade, e a seus funcionários na pessoa do Prof. Apóstolo que cederam a rotina de seu atendimento pra que eu pudesse acompanhar o atendimento e coletar as amostras necessárias ao estudo. Foi um prazer trabalhar com toda equipe do Hospital, sem sua colaboração eu não teria obtido êxito;

Ao Laboratório do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, em especial a Euder e Maria, que se prontificaram desde o início a colaborar, mas fizeram muito mais do que isso, torceram e tornaram o período de coleta de amostras muito mais que agradável. Aprendi muito e certamente suas colaborações foram fundamentais;

Ao Laboratório de Diagnóstico Centro-Oeste, especialmente à Karina A. Lemes Rocha, ao sempre prestativo Tiago; ao Laboratório Diagnovet; em especial ao Dr. Frederico Hahneemann W. M do Nascimento e a Dra. Lívia Fernanda de Oliveira, por enviarem amostras de sua rotina, essenciais para este estudo. A parceria com vocês foi muito importante e sem ela certamente não haveria amostras tão diversas;

Ao Prof. Ruy Lino do Instituto de Patologia Tropical, por ceder seu laboratório para que eu pudesse fotografar as lâminas e o programa utilizado para o estudo morfométrico deste trabalho;

Muito Obrigada aos meus amigos de pós Graduação e todos os demais que contribuíram por tornar tão agradável os dias de convivência.

Ao programa de Pós-Graduação desta Escola por disponibilizar toda a estrutura necessária para a realização desse trabalho;

À Universidade Federal de Goiás, especialmente ao Departamento de Medicina Preventiva, minha segunda casa, por me acolher com tanto carinho e contribuir para minha formação. Agradeço ao carinho de todos os funcionários Dna Cissa, João, Heleonilson, Dorinha, Lurdes, Vera, Dna Aparecida, Euzinha, pelo carinho de sempre. Às Professoras Valéria e Auxiliadora, anjos de plantão no departamento e todos os demais que tornam este setor tão acolhedor.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação pessoal e profissional, Se eu fosse enumerar todas as pessoas a quem devo gratidão certamente o espaço disponível seria insuficiente.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível".

S. Francisco de Assis

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 – Histórico | 3 |
| 2.2 - Espécies do Gênero <i>Babesia</i> que acometem os cães | 3 |
| 2.3 - Diagnóstico Diferencial | 7 |
| 2.4 - Diagnóstico Laboratorial | 16 |
| 3. OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 Objetivos Gerais | 17 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 - Local de realização do experimento | 18 |
| 4.2 - Obtenção de isolados de <i>Babesia</i> spp. | 18 |
| 4.3 - Exames dos Esfregaços sanguíneos | 19 |
| 4.4 - Extração do DNA genômico dos isolados | 19 |
| 4.5 - Construção dos iniciadores de PCR | 20 |
| 4.6 - Ensaaios de PCR | 21 |
| 4.7 - Controles para as reações de PCR | 21 |
| 4.8 - Determinação da especificidade dos novos iniciadores | 22 |
| 4.9 - Determinação e avaliação da sensibilidade das reações | 22 |
| 4.10 - Leitura das reações de PCR | 23 |
| 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 5.1 - Caracterização morfológica de isolados de <i>Babesia</i> spp. | 24 |
| 5.2 - Construção de iniciadores gênero e subespécie-específicos | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.2 - Avaliação de especificidade dos ensaios de PCR | 32 |
| 5.4 - Avaliação da sensibilidade dos ensaios de PCR | 36 |
| 5.5 - Caracterização molecular de isolados de <i>Babesia</i> spp. | 38 |
| 6 – CONCLUSÕES | 42 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Formas intra-eritrocíticas de <i>Babesia</i> spp. em esfregaços sanguíneos de cães anêmicos, procedentes da cidade de Goiânia, Goiás. A à D: isolado 02, E: isolado 03, F: isolado 04, G e H: isolado 07, I: isolado 09, J e L: isolado 11, M e N: isolado 12, O: isolado 19, P e Q: isolado 20, R: isolado 32, S: isolado 33, T: isolado 34, U: isolado 37. | 27 |
| Figura 2 | Formas intra-eritrocíticas isoladas, arredondadas e amebóides de <i>Babesia</i> sp. em esfregaços sanguíneos de cães anêmicos, procedentes da cidade de Goiânia, Goiás. A: isolado 02, B: isolado 06, C: isolado 13, D e E: isolado 15, F, G e H: isolado 17, isolado 17, I: isolado 23, J: isolado 33, L: isolado 34, M: isolado 38. | 28 |
| Figura 3 | Alinhamento do gene 18S RNAr de <i>B. canis canis</i> (acesso GenBank AY072926), <i>B. canis rossi</i> (AY072925), <i>B. gibsoni</i> (AF231350), <i>B. bovis</i> (L31922), <i>B. bigemina</i> (X59604) e <i>B. equi</i> (Z15105), com localização do iniciador <i>forward</i> genérico BAB1. | 29 |
| Figura 4 | Alinhamento de sequências localizadas entre a extremidade 3' do gene 18S RNAr e o 28S RNAr (inclusive 5,8S RNAr, ITS1 e ITS2) das subespécies <i>B. c. canis</i> (AF394533), <i>B. c. vogeli</i> (AF394534) e <i>B. c. rossi</i> (AF394535), com localização dos iniciadores BAB3, BAB4 e BAB5. | 31 |
| Figura 5 | Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores <i>B. c. canis</i> -específico, BAB1/BAB3: 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de <i>B. canis canis</i> ; 3- DNA de <i>B. canis vogeli</i> ; 4- DNA de <i>B. canis rossi</i> ; 5- DNA de <i>E. canis</i> , 6- DNA de <i>H. canis</i> , 7- DNA de <i>M. haemocanis</i> , 8- DNA de <i>B. equi</i> , 9- DNA de <i>B. gibsoni</i> , 10- DNA de cão livre de infecção, 11 - controle negativo. | 34 |
| Figura 6 | Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores <i>B. c. vogeli</i> -específico: BAB1/BAB4 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de <i>B. canis vogeli</i> ; 3- DNA de <i>B. canis canis</i> , 4- DNA de <i>B. canis rossi</i> ; 5- DNA de <i>E. canis</i> , 6- DNA de <i>H. canis</i> , 7- DNA de <i>M. haemocanis</i> , 8- DNA de <i>B. equi</i> , 9- DNA de <i>B. gibsoni</i> , 10- DNA de cão livre de infecção, 11 - controle negativo. | 34 |
| Figura 7 | Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores <i>B. c. rossi</i> -específico: BAB1/BAB5 | 35 |

1- marcador de 100 pb; **2-** DNA de *B. canis rossii*; **3-** DNA de *B. canis canis*, **4-** DNA de *B. canis vogeli*; **5-** DNA de *E. canis*, **6-** DNA de *H. canis*, **7-** DNA de *M. haemocanis*, **8-** DNA de *B. equi*, **9-** DNA de *B. gibsoni*, **10-** DNA de cão livre de infecção, **11** - controle negativo.

Figura 8 Eletroforese dos fragmentos de 590pb amplificados por PCR com o par iniciador BAB1/BAB4, a partir de diferentes concentrações de hemácias infectadas por *B. c. vogeli*: **1-** Marcador de 100pb; **2-** 15.675 hemácias infectadas; **3-** 1.567 hemácias infectadas; **4-** 156 hemácias infectadas; **5-** 15 hemácias infectadas; **6-** uma hemácia infectada; **7-** nenhuma hemácia infectada; **8-** Controle negativo. 37

Figura 9 Eletroforese de produtos de 590 pb de *B. c. vogeli* obtidos pela PCR com o par de iniciadores BAB1/BAB4. **1-** marcador de 100 pb; **2 a 11-** Isolados de números 1 a 10; **12-** controle positivo; **13-** controle negativo. 41

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Iniciadores selecionados para a amplificação de fragmentos de 30
sequências localizadas entre os genes 18S RNAr e 28S RNAr
de *B. canis*, pela PCR.
- Quadro 2 Pares de iniciadores estabelecidos para a amplificação 32
fragmentos subespécies-específicos de sequências localiza
entre os genes 18S RNAr e 28S RNAr de *B. canis*, pela reação
PCR.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| TABELA 1 | Medidas de trofozoítos intra-eritrocitários em esfregaços sanguíneos de isolados de <i>Babesia</i> sp. procedentes de cães da cidade de Goiânia. | 26 |
|----------|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| A | Adenina |
| BCC | <i>Babesia canis canis</i> |
| BCV | <i>Babesia canis vogeli</i> |
| BCR | <i>Babesia canis rossi</i> |
| BE | <i>Babesia equi</i> |
| BG | <i>Babesia gibsoni</i> |
| C | Citosina |
| °C | <i>Graus Celsius</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeos |
| G | Guanina |
| h | Horas |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| mL | Mililitro |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| mM | Milimolar |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| DNAr | Genes que codificam RNAr |
| RNAr | RNA ribossômico |
| T | Timina |
| T _a | Temperatura de anelamento |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |
| UV | Ultra-violeta |

RESUMO

Babesiose canina é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Babesia*, clinicamente caracterizada por febre, anemia e hemoglobinúria. Mundialmente são reconhecidas as espécies *Babesia gibsoni* e *B. canis*, sendo esta última classificada entre as subespécies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*. Estes microorganismos apresentam diferenças de morfologia, patogenicidade e estrutura molecular. Para a região Centro-Oeste do Brasil não constam publicações que abordem a questão etiológica da babesiose canina. O objetivo deste trabalho foi estudar a etiologia da babesiose em cães procedentes da cidade de Goiânia, Goiás, e a validação de ensaios de PCR para a discriminação dos agentes em nível de espécie e subespécie. O trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias e no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Foram utilizados 43 isolados obtidos pela coleta de sangue dos cães atendidos com sinais clínicos sugestivos de hemoparasitose. Este material foi utilizado para a preparação de esfregaços sanguíneos corados em lâminas e para o processo de extração de DNA genômico. Ao mesmo tempo foram construídos iniciadores para a amplificação subespécie-específica para *B. c. canis*, *B. c. vogeli* e *B. c. rossi*. A maioria dos isolados do estudo apresentou formas intra-eritrocitárias com características morfológicas semelhantes à *B. canis lato sensu*. Os pares de iniciadores, construídos neste estudo foram eficazes para a amplificação precisa dos fragmentos-alvo esperados. A análise dos resultados obtidos foi possível concluir que os novos pares de iniciadores BAB1/BAB3, BAB1/BAB4 e BAB1/5 foram eficientes para a amplificação de fragmentos subespécie-específicos de 746 pb (*B. c. canis*), 546 pb (*B. c. vogeli*), e 342 pb (*B. c. rossi*), pela técnica de PCR. Os ensaios de amplificação enzimática empregando os novos iniciadores avaliados neste estudo apresentaram-se como ferramenta original e confiável para a discriminação entre as subespécies de *B. canis* pela reação de PCR.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia canis rossi*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis*, PCR, babesiose canina, hemoparasitoses.

ABSTRACT

Canine babesiosis is a disease caused by protozoans of the genera *Babesia* that is clinically characterized by fever, anemia and haemoglobinuria. The species involved are worldwide referred as *Babesia gibsoni* and *Babesia canis*. The later is yet classified under subspecies level as *B. canis canis*, *B. canis vogeli* and *B. canis rossi*. These organisms may be discriminated on the basis of morphology, pathogenicity and molecular structure. At the present no publication is available regarding the ethiology of canine babesiosis in the Central-West region of Brazil. The objective of the present study was to study the ethiology of canine babesiosis in dogs from the city of Goiânia, State of Goiás, as well as to evaluate and validate a PCR assay to discriminate the organisms at the subspecies level. The experiments were conducted in the Parasitic Disease Diagnostic Laboratory and in the Veterinary Hospital of the Veterinary School of the Federal University of Goiás. 43 isolates were obtained from dogs presenting hemoparasitosis-like clinical signs. The samples were submitted to blood smear and other hemathological examinations and DNA extraction. Concomitantly, primers were constructed for the subspecies-specific detection of *B. c. canis*, *B. c. vogeli* and *B. c. rossi*. The majority of the isolates in this study presented intraeritrocytic bodies with morphological features that most resembled *B. canis sensu lato*. The primer pair designed in this study specifically amplified the expected target fragments with precise specificity. The analysis of the results permitted the conclusion that primer pairs BAB1/BAB3, BAB1/BAB4 and BAB1/BAB5 showed efficacy and reliability to respectively amplify subspecies-specific fragments of 746pb (*B. c. canis*), 546pb (*B. c. vogeli*) and 342pb (*B.c. rossi*) by PCR. The original enzymatic amplification assays with novel primers reported in this paper were proved to be reliable tools for the specific discrimination among *B. canis* subspecies by PCR.

KEYWORDS: *Babesia canis rossi*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis*, PCR, canine babesiosis, hemoparasitosis.

1. INTRODUÇÃO

Babesiose canina é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Babesia*, clinicamente caracterizada por febre, anemia e hemoglobinúria.

A elevada casuística, ampla distribuição geográfica e a gravidade dos processos patológicos, observados em infecções isoladas ou associadas a outros hemoparasitos garantem à babesiose canina uma relevante importância na rotina da clínica médica de cães.

São conhecidas duas espécies do gênero *Babesia* capazes de provocar infecção natural nesses animais, a *B. gibsoni* e a *B. canis*, sendo esta última classificada em três sub-espécies: *B. canis canis*, encontrada na Europa, *B. canis vogeli*, no Norte da África, América do Norte e Brasil e *B. canis rossi* encontrada no Sul da África.

As espécies de *Babesia* podem ser diferenciadas com base na avaliação morfométrica, pela patogenicidade para o hospedeiro vertebrado e pela adaptação às espécies de vetores potencialmente capazes de atuarem na transmissão.

O exame microscópico direto do esfregaço sanguíneo constitui-se no método convencionalmente empregado para o diagnóstico diferencial entre *B. canis* e *B. gibsoni*, tendo como base as características morfométricas de referência para cada espécie. No entanto, esse método não permite discriminação em nível de subespécie para *B. canis*. Para essa finalidade tem sido aplicada técnicas de biologia molecular.

Entre as técnicas moleculares tem sido empregado a análise filogenética de fragmentos de DNA amplificados por PCR e análises de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de produtos de PCR. Apesar de oferecerem resultados conclusivos quanto à identificação dos organismos em nível de sub-espécie, estes métodos requerem para sua execução, a utilização de equipamentos de elevado custo financeiro, pessoal altamente especializado e ainda, por serem processos laboriosos, necessitam de tempo prolongado para a obtenção dos resultados.

A associação destes fatores geralmente inviabilizam a utilização destas técnicas na rotina do diagnóstico laboratorial de hospitais e clínicas veterinárias. Existe, portanto, a necessidade de desenvolvimento e adaptação de novos protocolos e construção de iniciadores que possam ser utilizados na detecção direta numa reação simples de PCR, para discriminação subespécie-específica de *B. c. canis*, *B. c. vogeli* e *B. c. rossi*.

No Brasil, a babesiose canina, apesar de ser considerada uma enfermidade endêmica, tem sido pouco estudada em nível de biologia molecular. Nos estudos publicados, até a presente data, PASSOS et al. (2005) em Minas Gerais e DE SÁ et al (2006), no Rio de Janeiro caracterizaram as amostras estudadas pertencentes à subespécie *B. c. vogeli*. Foi realizado recentemente, estudo com amostras provenientes do Sul do Brasil, onde a espécie encontrada foi *B. gibsoni*, caracterizando o primeiro relato confirmado por técnicas de biologia molecular para esta espécie no País.

Para a região Centro-Oeste não existem referências na literatura sobre as questões envolvendo a etiologia da babesiose canina em nível de espécies e subespécies.

O diagnóstico laboratorial executado pelos laboratórios particulares e de instituições de ensino é feito, geralmente, com base na identificação microscópica dos parasitos em lâminas de esfregaços sanguíneos coradas, atribuindo o nome de *B. canis* às formas de trofozoítos e merozoítos intra-eritrocitários, independentemente de suas dimensões. A experiência de inúmeros profissionais que atuam no diagnóstico de hemoparasitoses de cães, na região, aponta para a ocorrência de formas morfológicas intra-eritrocíticas variadas, sendo que em alguns momentos prevalecem formas pequenas e em outros, formas grandes.

Na cidade de Goiânia é freqüente a ocorrência de cães doentes por enfermidades registradas como hemoparasitoses, entre estas, a babesiose canina se destaca do total avaliado. É possível observar diferentes intensidades clínicas da enfermidade nos cães que podem ser atribuídas de forma especulativa, a diversos fatores, entre os quais à diversidade de espécies, já que não existem estudos sobre o assunto nessa localidade.

Diante do exposto, fica evidente a carência de estudos em nível molecular visando o esclarecimento sobre a participação das espécies e sub-espécies envolvidas com a babesiose canina em Goiânia e, dessa forma, contribuir para melhor compreensão da sua epidemiologia no país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Histórico

A primeira descrição de um protozoário babesídeo ocorreu em 1888 quando o pesquisador Babès, avaliando sangue de bovinos procedentes na Romênia, relatou a ocorrência de microrganismo intra-eritrocitário, ao qual denominou de *Hematococcus bovis*, atribuindo o termo da enfermidade de hemoglobinúria enzoótica. A criação do gênero *Babesia* ocorreu nesse mesmo ano, quando Starcovici propôs a sua criação em homenagem ao pesquisador Babès e renomeou o microrganismo descrito por aquele autor como *Babesia bovis* (KUTTLER, 1988).

O registro de babesídeo em cães somente aconteceu no ano de 1895, quando Piana & Galli-Valério observaram a existência de parasitos grandes nas hemácias de cães na Itália descrevendo-os como *Piroplasma canis*. Posteriormente, PATTON (1910) citado por ALMOSNY et al (2002) descreveu a presença de formas parasitárias anelares e ovóides em hemácias de cães na Índia, classificando-as como *Piroplasma gibsoni* em homenagem ao Dr. Gibson, primeiro observador deste parasito.

2.2 - Espécies do Gênero *Babesia* que acometem os cães

2.2.1 *Babesia canis*

A enfermidade acomete cães domésticos e canídeos silvestres apresentando sinais clínicos múltiplos e variáveis, de acordo com a evolução clínica, fatores genéticos, raça, idade, estado imune, condições de estresse e

espécie ou cepa do parasito. A doença pode ocorrer nas formas hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica (GUIMARAES et al., 2002).

Os cães acometidos podem apresentar sinais como incordenação motora, ataxia e depressão em casos que envolvam cepas capazes de desencadear formas nervosas da enfermidade pela localização em capilares do sistema nervoso central. Em outras ocasiões são observados diferentes tipos de hemorragias (petéquias, equimoses e epistaxe) (RISTIC, 1988).

Na hematologia há evidência de um quadro típico de anemia hemolítica, causada pela multiplicação dos microrganismos, e conseqüente hemólise intravascular associada a um processo de hemólise imunomediada. Essa anemia, inicialmente, é do tipo normocítica normocrômica e à medida que a doença evolui clinicamente apresenta-se macrocítica hipocrômica e regenerativa, sendo caracterizada por reticulocitose, anisocitose, esferocitose e policromasia. Há também trombocitopenia, hemoglobinemia e bilirrubinemia. As alterações leucocitárias são inconsistentes e incluem leucopenia (neutropenia) nos estágios iniciais da doença e leucocitose neutrofílica na fase de recuperação (FELDMAN et al., 2000; GOODGER et al., 1998).

A espécie *B. canis* apresenta distribuição geográfica cosmopolita, com maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, sendo transmitida pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*. Alguns autores reportaram ainda a transmissão experimental de *B. canis* por *Dermacentor andersoni* e *Hyalomma marginatum* (HOSKINS, 1991; TABOADA & MERCHANDT, 1991).

B. canis é um parasito do grupo das “grandes babesias”, sendo encontrada nos eritrócitos dos cães sob as formas de merozoítos e trofozoítos ou, ainda, assumindo características amórficas ou amebóides que correspondem a diferentes fases do processo de divisão binária.

Os merozoítos da *B. canis* medem em torno de 2,4 µm x 5,0 µm (HOSKINS, 1991) ou 2,5 a 3,0 µm x 5,0 µm (KUTTLER, 1988) quando observados microscopicamente e se apresentam aos pares, de um a oito, no interior das hemácias (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1998).

Exames de esfregaços sanguíneos mostram os parasitos tipicamente piriformes, agrupados em pares ligados pela extremidade mais fina, formando um ângulo agudo. Possuem um núcleo que ocupa posições variadas no citoplasma do eritrócito. Corados pelo Giemsa apresentam o citoplasma azulado e o núcleo rosa (MASSARD & O'DWYER, 2002). Os trofozoítos são estruturas isoladas no interior da hemácia e como precursores dos merozoítos apresentam aspecto arredondado com dimensões maiores, observados no esfregaço sanguíneo apresentam formas ovais, alongadas ou amebóides (ALMOSNY, 2002).

Atualmente, são reconhecidas três subespécies distintas, *B. c. canis*, *B. c. rossi* e *B. c. vogeli*. A *B. c. rossi* é considerada a mais patogênica e fatal, enquanto que para *B. c. canis* são atribuídas infecções moderadas e, para a *B. c. vogeli* infecções benignas ou inaparentes (UILEMBERG et al., 1989; SCHETTERS et al., 1997). De acordo com CARRET et al (1999) evidências sugerem que isolados de *B. canis* de regiões distintas do mundo apresentam diferenças genéticas e antigênicas, apesar da similaridade morfológica entre as mesmas. A classificação de *B. canis* em subespécies tem sido sustentada também por diferenciações sorológicas (UILEMBERG et al., 1989) e pela demonstração de polimorfismo genético distinto (CARRET et al., 1999).

Entre estas espécies de carrapatos, apenas o *R. sanguineus* tem ocorrência confirmada no Brasil, apresentando uma ampla distribuição geográfica (LABRUNA & PEREIRA, 2001, GUIMARAES et al., 2001). No entanto, a introdução de outras espécies de carrapatos em função do crescente movimento de cães entre fronteiras de diferentes situações epidemiológicas, motivado pelo comércio internacional de animais, pode contribuir para a expansão da distribuição geográfica dos mesmos (ZAHLER et al., 1998).

Todos os estádios dos carrapatos podem transmitir *Babesia* sp., entretanto, os adultos (machos e fêmeas) são considerados os principais transmissores por apresentarem maior quantidade de esporozoítos na saliva. Os carrapatos podem permanecer infectivos por várias gerações (RISTIC, 1988).

No Brasil a babesiose canina tem sido documentada em alguns Estados como São Paulo (DELL' PORTO et al., 1993), Pernambuco (DANTAS-TORRES & FIGUEIREDO, 2006), Rio Grande do Sul (BRACCINI et al., 1992), Rio de Janeiro (GUIMARAES et al., 2004, DE SÁ et al., 2006), Minas Gerais (GUIMARAES et al., 2002; BASTOS et al., 2004) e Paraná (TRAPP et al., 2006).

2.2.2 *Babesia gibsoni*

B. gibsoni é transmitida pelos carrapatos *Haemaphysalis bispinosa* e *R. sanguineus*. É um parasito pequeno, com tamanho de 1,2µm x 1,9µm de acordo com KUTTLER (1988) podendo medir 1,0 µm x 3,2 µm de acordo com HOSKINS, (1991), normalmente encontrado em formas isoladas no interior das hemácias. Os cães acometidos por esse agente apresentam praticamente os mesmos sinais clínicos observados nas infecções por *B. canis*.

Esse parasito é encontrado na Ásia, América do Norte, África, Europa (KJEMTRUP et al., 2000), Japão (ANO et al., 2001; INOKUMA et al., 2004) e Austrália (MUHLNICKEL et al., 2002; JEFFERIES et al., 2003).

Existem três isolados geneticamente distintos, mas, morfologicamente semelhantes, de diferentes regiões geográficas: Ásia, Califórnia e Europa. O isolado da Ásia é considerado o organismo original *B. gibsoni stricto sensu* (KJEMTRUP & CONRAD, 2006).

No Brasil, até o momento, o único relato de *B. gibsoni* baseava-se em exames laboratoriais, considerando aspectos morfológicos no Rio Grande do Sul (BRACCINI et al., 1992). Entretanto, TRAPP et al (2006) relataram a ocorrência de *B. gibsoni* em amostras do Sul do País, utilizando técnicas moleculares que demonstraram 100% de homologia com o subtipo Ásia 1.

2.2.3 *Babesia equi*

Testes moleculares revelaram a presença desse agente em cães assintomáticos da Espanha, confirmando a possibilidade de transmissão desse patógeno a esses animais (CRIADO-FORNELIO et al., 2004).

ZAHLER et al (2000) afirmaram que o parâmetro morfológico isolado não é suficiente para distinção de todos os babesídeos, por exemplo, entre *Babesia microti*, *B. equi* e *B. gibsoni*. Por isso é de grande importância a realização de testes moleculares que confirmem a identidade do microrganismo envolvido nas infecções dos animais.

Para esta finalidade é necessário o emprego de testes moleculares nos estudos relativos a etiologia da babesiose canina.

2.3 Diagnóstico Diferencial

No diagnóstico diferencial da babesiose canina devem ser consideradas outras hemoparasitoses que também acometem os cães e cursam com sinais clínicos semelhantes como anemia, icterícia, febre, esplenomegalia e hemorragia. É importante considerar no diagnóstico diferencial a erliquiose (causada por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*), a hepatozoonose canina (*Hepatozoon canis*) e a micoplasmose canina (*Mycoplasma haemocanis*). No Brasil há registro ainda da rangelirose canina (*Rangelia vitalii*), no entanto, seu reconhecimento no meio científico ainda requer mais estudos (LORETTI & BARROS, 2005).

Pode haver ainda infecções simultâneas por diferentes agentes, devido o carrapato vetor ter possibilidade de transmitir mais de um patógeno. O *R. sanguineus* pode, por exemplo, transmitir *E. canis*, *H. canis*, *A. platys*, *B. canis* e *B. gibsoni* (SHAW et al., 2001). A infecção simultânea pode acentuar os sinais clínicos dessas enfermidades.

2.3.1 Erliquiose por *Ehrlichia. canis*

A erliquiose causada por *E. canis*, também conhecida por pancitopenia tropical canina é uma doença sistêmica, altamente variável na sua apresentação clínico-patológica. Existem outras espécies do gênero que também infectam cães, como a *E. chaffeensis* e *E. ewingii*; no entanto, *E. canis* é a mais prevalente e a que apresenta maior distribuição geográfica, sendo também considerada a mais virulenta (HOSKINS, 1991).

E. canis é cosmopolita e está intimamente relacionada com a distribuição do seu vetor biológico, o carrapato *R. sanguineus*, conhecido como o carrapato vermelho do cão (WOODY & HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT, 2000). É reportada na grande maioria das regiões tropicais e subtropicais do planeta (BREITSCHWERDT, 2000).

E. canis é uma bactéria Gram negativa que apresenta parasitismo intracelular obrigatório, e infecta preferencialmente, leucócitos da série agranulocítica. É responsável por processos patológicos complexos que

invariavelmente culminam com trombocitopenia que, muitas vezes, é acompanhada por anemia e leucopenia (BICHARD & SHERDING, 1998).

O vetor da erliquiose canina, o carrapato *R. sanguineus*, se infecta ingerindo sangue infectado pelo microrganismo. No interior do ácaro a *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e nas células da glândula salivar, podendo haver transmissão transestadial. Todos os estádios do carrapato podem sofrer infecção, ou seja, larva, ninfa e teleóquina (ALMOSNY, 2002).

O carrapato infectado inocula o agente durante a fixação e alimentação. Por sua vez, a riquetsia invade os linfócitos e monócitos formando mórulas, estruturas compostas de corpúsculos iniciais, que se rompem e liberam organismos que infectam outras células mononucleares e linfócitos. O parasito infecta células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) inicialmente na circulação, e posteriormente invade órgãos como baço, fígado e linfonodos acarretando hepato e esplenomegalia (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A estimulação do sistema imune provoca destruição plaquetária, pela formação de anticorpos anti-plaquetas, levando à trombocitopenia, que se exacerba pela ação direta do parasito nestas células. A diminuição da ingestão de proteínas acarreta perda de peso e decréscimo na produção de proteínas. A medula óssea se torna hipoplásica com depleção de megacariócitos (HAGIWARA & BRANDÃO, 2002).

A doença pode apresentar-se nas formas aguda, subclínica e crônica, identificadas por meio das alterações clínico-patológicas. Em todas as fases o animal pode apresentar anemia, leucopenia e trombocitopenia, sendo que os mecanismos causadores destas alterações hematológicas variam nas diferentes fases de evolução da doença (WOODY & HOSKINS, 1991).

Sua ocorrência no Brasil foi registrada pela primeira vez por COSTA et al. (1973) e, atualmente, é observada em de cães em todo o país (SEIBERT, 1996; ANDEREG & PASSOS, 1999; O'DWYER et al., 2001, ALVES et al., 2005, MACIEIRA et al., 2005).

2.3.2 Erliquiose por *Anaplasma platys* ou Trombocitopenia Cíclica Canina

A trombocitopenia cíclica canina é uma doença infecciosa de cães causada pela riquetsia *Anaplasma platys* (= *Ehrlichia platys*). Sua transmissão ocorre pelo carrapato *R. sanguineus* e se caracteriza clinicamente por trombocitopenia cíclica, anorexia, letargia, perda de peso e depressão. O diagnóstico é realizado pela observação em esfregaço sanguíneo em lâmina do parasito no interior de plaquetas, porém, devido ao tamanho do parasito e sua morfologia, essa técnica exige experiência. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método mais apropriado para a confirmação do diagnóstico (ALMOSNY, 2002, INOKUMA et al., 2002).

O parasito se localiza em plaquetas, onde se multiplicam por divisão binária originando inclusões de 0,4 µm a 1,2 µm com aspecto arredondado ou oval, envolto por membrana dupla.

Recentemente, esse organismo teve sua taxonomia reavaliada, passando da antiga designação à nova classificação, integrando, portanto a família *Anaplasmataceae*, gênero *Anaplasma* (DUMLER, 2002).

Os animais infectados por *A. platys* apresentam sinais clínicos semelhantes aos descritos para *E. canis*, no entanto, o agente é responsável por quadros clínicos variáveis, podendo ocorrer de forma branda e subclínica, ou grave e aguda, dependendo da cepa infectante e defesa orgânica do animal (ALMOSNY, 2002).

Existem relatos da identificação desse parasito na Austrália (BROWN et al., 2006), Espanha (AGUIRRE et al., 2006), Venezuela (HUANG et al., 2005) África (SANOGO et al., 2003) e Japão (INOKUMA et al., 2002; INOKUMA et al., 2003). No Brasil as evidências são baseadas apenas nos sinais clínicos dos animais avaliados, não havendo estudos publicados com identificação molecular do agente.

2.3.3 Hepatozoonose canina

A hepatozoonose é uma enfermidade infecciosa cosmopolita, causada por hemoparasitos do gênero *Hepatozoon*. Duas espécies podem acometer os cães domésticos: *Hepatozoon canis*, com maior prevalência no Norte da Europa, África, Ásia e Américas, observado também no Brasil (ALENCAR et al., 1997; PALUDO et al., 2003; RUBINI et al., 2005, CRIADO-FORNELIO et al., 2006) e o *Hepatozoon americanum* detectado principalmente nos EUA e sem relatos no Brasil (BANETH et al., 2003).

H. canis é um protozoário parasito de cães e carnívoros silvestres, transmitido pelo carrapato *R. sanguineus* (BANETH et al., 2003). Estudos recentes demonstraram a transmissão experimental de *H. canis* pelo carrapato *Amblyomma ovale* procedentes de ambientes rurais e silvestres no Estado do Rio de Janeiro (FORLANO et al., 2005).

A transmissão ocorre por meio da ingestão do ácaro infectado por oocistos maduros de *H. canis*. Estudos epidemiológicos demonstraram uma maior frequência de parasitismo em cães criados em áreas rurais (O'DWYER et al., 2001).

A infecção do carrapato inicia-se no estágio de ninfa e completa-se na fase adulta. Os ácaros são infectados ao ingerirem sangue de cães que contenham gametócitos no interior de neutrófilos ou monócitos. No tubo digestivo do vetor ocorre a fusão dos gametas, com posterior formação de oocinetos que passam para a hemocele do carrapato (O'DWYER & MASSARD, 2001).

O cão se infecta ao ingerir carrapatos com oocistos maduros na hemocele. Com a digestão ocorre a liberação de esporozoítos, os quais penetram na parede intestinal e são transportados, via sanguínea, até o baço, linfonodos, fígado, medula óssea, pulmões e músculos. Nesses locais multiplicam-se, formando dois tipos distintos de esquizontes, cada qual contendo micromerozoítos e macromerozoítos (BANETH et al., 2003). Podem ser observados em esfregaços sanguíneos na forma de gametócitos em leucócitos.

Existem evidências de diferenças na patogenicidade determinada por esse agente nos animais das diferentes regiões do país e do mundo. Embora haja divergências relativas a essa enfermidade, a maioria dos estudos comprova que a

associação entre diferentes parasitos leva a um quadro clínico mais grave quando comparado ao parasitismo isolado.

Os cães acometidos por *H. canis* frequentemente são assintomáticos e os relatos estão em sua maioria associados a encontros casuais e associados a outros agentes. Existem divergências entre pesquisadores sobre a patogenia provocada pelo parasito. Na França, foram identificados casos clínicos graves de hepatozoonose em cães sem associação a outros agentes (O'DWYER & MASSARD, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstraram alta freqüência desse parasito em cães provenientes de áreas rurais. A sintomatologia dos animais doentes observada no Brasil é caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, anemia, dor, diarreia, polidipsia e poliúria. Entretanto, esses sinais foram avaliados em animais que apresentavam doenças intercorrentes (GONDIM et al., 1998).

Os exames laboratoriais revelam leucocitose neutrofilica, linfopenia, e monocitose, pode-se observar também elevação da creatininaquinase sérica e fosfatase alcalina. Os cães acometidos podem demonstrar fraqueza dos membros posteriores e corrimento ocular, sinais característicos de enfermidades de caráter crônico debilitante (O'DWYER & MASSARD, 2001).

No Brasil, a prevalência da infecção por *H. canis* pode ser bastante elevada, podendo chegar a 59% em algumas regiões. O parasito já foi encontrado em São Paulo (ALENCAR et al., 1997), Minas Gerais, Rio de Janeiro (O'DWYER & MASSARD, 2001), Brasília (PALUDO et al., 2003), e Rio Grande do Sul (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

Como existem poucos estudos sobre essa enfermidade, ainda não é possível mensurar o papel desse protozoário nas alterações clínicas e laboratoriais. Dessa forma, as pesquisas têm procurado identificar as alterações clínicas e patológicas de cães infectados e ainda a caracterização molecular do agente (RUBINI et al., 2005; CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

2.3.4 Micoplasmose canina

A micoplasmose canina é uma enfermidade de distribuição mundial causada pela bactéria *Mycoplasma haemocanis*, conforme recente classificação baseada em análises moleculares. Nessa reclassificação, o agente anteriormente denominado *Haemobartonella canis* passou a ser denominado *M. haemocanis*, integrando o gênero *Mycoplasma*, deixando assim de pertencer a família *Anaplasmataceae* (MESSICK et al., 2002).

O *M. haemocanis* é uma bactéria que infecta a parede de eritrócitos, formando cocos, hastes ou pequenas correntes na superfície dos mesmos (JAIN, 1993).

A transmissão pode ser vertical, da mãe para os filhotes, e horizontal, pelo sangue infectado. Pode ocorrer também por meio do carrapato *R. sanguineus* e outros insetos hematófagos. No hospedeiro vertebrado os organismos replicam por fissão binária na superfície dos eritrócitos afetados. O microrganismo acarreta anemia hemolítica no cão pela ação direta no eritrócito (ALMOSNY, 2002).

Os eritrócitos parasitados apresentam aspecto esférico e podem ser seqüestrados no baço e retornar à circulação após a remoção dos organismos reassumindo assim seu aspecto bicôncavo. Porém, a parasitemia dos eritrócitos pode levar a produção de anticorpos anti-eritrocitários, que determinam fagocitose por ação dos macrófagos, diminuindo a meia vida dos mesmos (NASH & BOBADE, 1993).

Existem poucas informações a respeito da prevalência da infecção nos cães, já que muitos indivíduos infectados não apresentam sinais clínicos da enfermidade. Animais portadores de doença esplênica, animais esplenectomizados, sob ação de drogas imunossupressoras ou co-infectados com vírus, bactérias e outros hemoparasitos podem manifestar a enfermidade. E, portanto, a doença afeta essencialmente animais esplenectomizados ou imunocomprometidos (NASH & BOBADE, 1993).

A infecção é normalmente assintomática, entretanto, em animais imunossuprimidos podem manifestar sinais como anemia intensa, icterícia, apatia, fraqueza, febre, anorexia, perda de peso, sopro cardíaco (ALMOSNY, 2002).

KIKUTH (1928) citado por ALMOSNY et al. (2002), descreveram duas diferentes manifestações clínicas em cães: a forma aguda e a crônica. Na forma aguda observou anemia profunda de pouca duração causando óbito. Na fase crônica constatou anemia persistente e recidivante, sendo, raramente, fatal. Nesses casos, os sinais clínicos são geralmente inaparentes, mas nos animais submetidos a causas predisponentes, os episódios clínicos reaparecem.

Os achados hematológicos incluem anemia hemolítica macrocítica e hipocrômica regenerativa, com presença acentuada de eritroblastos, reticulócitos e corpúsculos de Howell Jolly, bem como anisocitose e policromÁsia evidentes (ALMOSNY, 2002).

2.3.5 Rangeliose

Rangeliose é descrita como uma enfermidade causada pelo protozoário *Rangelia vitalli* que é transmitido pelos carrapatos *A. aureolatum* e *R. sanguineus*, durante o hematofagismo. Esse agente infecta apenas cães, principalmente animais jovens, que uma vez infectados, podem se tornar portadores por longos períodos (LORETTI & BARROS, 2005).

O protozoário apresenta um estágio de desenvolvimento eritrocitário, em que se replica nas hemácias, e uma fase de desenvolvimento extra eritrocítica na qual o parasito se multiplica no interior de um vacúolo parasitóforo no citoplasma das células endoteliais dos capilares sangüíneos (PESTANA, 1910 citado por LORETTI & BARROS, 2005).

Cães infectados por *R. vitalli* podem apresentar os seguintes sinais clínicos: anemia, icterícia, febre intermitente, apatia, anorexia, desidratação, fraqueza, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, aumento generalizado dos linfonodos, hepatomegalia, paraplegia, edema dos membros posteriores, dispnéia após esforço físico, taquipnéia, hemorragias puntiformes (petéquias) nas mucosas visíveis, diarréia sanguinolenta e sangramento persistente pelas narinas, cavidade oral, locais de coleta de sangue (punção venosa), olhos e bordas e face externa das orelhas (LORETTI & BARROS, 2005).

Há situações em que o sangue goteja ininterruptamente pelas margens das orelhas. O curso clínico dessa protozoose pode variar de três dias (forma aguda da doença) a oito e 15 dias (forma subaguda) ou até 18-25 dias (forma crônica) (LORETTI & BARROS, 2005). Essas observações foram feitas no Brasil, único país onde existe relato da enfermidade. É necessário a realização de estudos que possam validar a etiologia da enfermidade e confirmar os dados existentes.

2.4 - Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico direto é o método convencional para diagnóstico de babesiose canina, o qual é realizado pela observação microscópica direta do parasito, em preparações de esfregaços sanguíneos corados. O exame apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade. Normalmente, são utilizadas colorações com base Romanovsky, entre estas Giemsa, Wright, Leishman, Rosenfeld e Panótico (BOSE et al., 1995).

No preparo de esfregaços sanguíneos devem ser utilizadas lâminas de microscopia previamente lavadas e mantidas imersas em solução álcool/éter para que se mantenham desengorduradas, permitindo uma melhor distensão do sangue na superfície da lâmina (KEER, 2003). O esfregaço sanguíneo deve ser fino, homogêneo e apresentar bordas livres e margens formando franja (FELDMAN et al, 2000). Normalmente, é possível observar o parasito na fase aguda da enfermidade, quando os parasitos se multiplicam mais intensamente na corrente sanguínea. Nessa fase, o exame direto é bastante indicado e pode-se observar o protozoário com facilidade, principalmente nas margens e franja dos esfregaços.

Hemácias infectadas por *B. canis* podem ficar retidas no endotélio vascular e como consequência originar a formação de obstruções da rede capilar no sistema nervoso central ou em outros tecidos. Neste caso, o exame *pós mortem* para detecção do parasito pode ser realizada pela microscopia de lâminas coradas, preparadas pela aposição do tecido nervoso (*imprint*), preferencialmente,

da substância cinzenta do cérebro. Por esta técnica os parasitos são evidenciados nos eritrócitos retidos no interior dos capilares (RISTIC, 1988).

Pode ser feito o diagnóstico também pelas técnicas sorológicas que apesar de apresentarem elevada sensibilidade, apenas confirmam um contato prévio com o microrganismo, o que não esclarece sobre o real estado da infecção no animal em dado momento (KUTTLER, 1988).

A imunidade protetora dura de quatro a cinco meses após infecção por *B. canis*. Não ocorre proteção cruzada contra cepas heterólogas de *B. canis*, sendo que a resposta imune pode não eliminar completamente o parasita e os cães podem tornar-se portadores crônicos (TABOADA, 1998).

Os testes sorológicos, de maneira geral, podem apresentar reações cruzadas gerando, assim, um obstáculo para a identificação da espécie infectante (BREITSCHWERDT, 2000).

Outro método de diagnóstico que tem sido utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica molecular que apresenta especificidade e sensibilidade muito elevada capaz de detectar fragmentos alvo de DNA do parasito em amostras de sangue, assim como de qualquer outro tipo de amostra clínica, estando ou não viáveis os parasitos (LAUERMAN, 1998).

É um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente sequências específicas de DNA, utilizando pequenos oligonucleotídeos que ligam-se a determinadas regiões de interesse do genoma. Para a amplificação, requer-se um conhecimento prévio da sequência alvo ou, pelo menos, parte dela, pois dois oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores) são utilizados para definir de forma específica o fragmento a ser amplificado, em uma reação com repetitivos ciclos de temperatura previamente definidos, na presença de bases nitrogenadas e da enzima *Taq* DNA polimerase (SILVA-PEREIRA, 2003).

A região do DNA genômico a ser amplificada é definida pelos oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, se anelando especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar. O procedimento consiste em uma série de ciclos repetidos de amplificação. Os

produtos amplificados servem como moléculas-molde do ciclo seguinte, duplicando o número de moléculas e, criando uma reação em cadeia (LAUERMAN, 1998).

Para o diagnóstico de hemoparasitos por PCR emprega-se o DNA total extraído de amostras de sangue coletadas com anticoagulante ou mesmo de outros tipos de amostras como: fragmentos de tecidos, líquidos orgânicos, dentre outros. Após os ciclos de amplificação é feita a análise de DNA por eletroforese em gel de agarose (SILVA-PEREIRA, 2003).

O princípio da técnica de PCR envolve três etapas básicas, requeridas na reação de síntese de qualquer DNA, que são repetidas por vários ciclos, compreendidos por três fases distintas: a) desnaturação térmica do DNA molde; b) anelamento dos *primers* a cada uma das fitas do DNA molde; c) polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, na presença da enzima *Taq* DNA polimerase, de dNTPs e íons magnésio, em uma mistura tamponada (SILVA-PEREIRA, 2003).

Variações da técnica de PCR têm sido desenvolvidas com objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica, entre estas o *nested*-PCR que utiliza dois pares de *primers* em etapas diferentes de amplificação. Esta técnica tem sido empregada no diagnóstico de vários microrganismos. O emprego da técnica promovendo aumento de sensibilidade e especificidade, porém é mais demorada, requer maior quantidade de reagentes e oferece maior risco de contaminação por manipulações excessivas do *amplicon* no laboratório (PERSING, 1993).

O RFLP-PCR é uma técnica utilizada por alguns pesquisadores para identificação da subespécie de *B. canis* (ZAHLER et al., 1998; DE SÁ et al., 2006). Nessa técnica, o produto obtido por PCR é digerido em locais específicos, previamente conhecidos, de acordo com a enzima utilizada. Após essa etapa obtêm-se um padrão de polimorfismo correspondente ao perfil de corte realizado pelas diferentes enzimas de restrição.

A análise filogenética realizada a partir do sequenciamento de fragmentos amplificados por PCR, tem sido a proposta atualmente, mais utilizada

para estudos genéticos das espécies e sub-espécies do gênero *Babesia* (CARRET et al., 1999; CACCIO et al., 2002; INOKUMA et al., 2003; JEFFERIES et al., 2003; BIRKENHEUER et al., 2004; OYAMADA et al., 2005; PASSOS et al., 2005; GULANBER et al., 2006; TRAPP et al., 2006). Esses estudos têm permitido maior elucidação genética dos microrganismos, permitindo a descoberta e proposição para novas espécies (CAMACHO et al., 2001; KJEMTRUP & CONRAD, 2006), pela obtenção das relações filogenéticas por meio da construção e análises de dendogramas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos a realização de estudo sobre a etiologia da babesiose em cães procedentes da cidade de Goiânia, Goiás, e a validação de ensaios de PCR para a discriminação dos agentes em nível de subespécie.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proceder a caracterização morfométrica e molecular de isolados de *Babesia* sp. em amostras de sangue provenientes de cães da cidade de Goiânia, Goiás;
- Construir iniciadores para a amplificação específica das diferentes subespécies de *B. canis* por PCR;
- Otimizar e validar protocolos para ensaios de PCR destinados à detecção específica das diferentes subespécies de *B. canis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período de realização

O trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias (LDDP) e do Hospital Veterinário (HV) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG), no período de 26 de janeiro a 12 de dezembro de 2006.

4.2 Obtenção de isolados de *Babesia* spp.

Dos cães atendidos para consulta no HV da EV/UFG, no período de execução deste trabalho, e que apresentavam sinais clínicos sugestivos de hemoparasitose, foram coletadas amostras de sangue com EDTA (Anticoagulante Universal, Doles) para a realização de exames parasitológicos. Não foram quantificados o número de cães avaliados.

Outras amostras foram, ainda, obtidas nos laboratórios particulares de diagnóstico veterinário (Diagnovet e Laboratório Centro-Oeste). Essas eram procedentes de cães atendidos em clínicas veterinárias localizadas em diferentes bairros da cidade de Goiânia.

As amostras foram, todas, utilizadas para o preparo de esfregaços sanguíneos visando a pesquisa e identificação de formas intra-eritrocitárias de organismos do gênero *Babesia*, conforme KUTTLE (1988) e HOSKINS (1991). Os esfregaços foram feitos em lâminas de microscopia pelo método convencional e, secos à temperatura ambiente. Foram fixados pelo metanol e corados por 30 minutos em solução de corante Giemsa (Merck), diluído em tampão fosfato de Sorensen, segundo CORREIA & CORREIA (1992).

Foram considerados como isolados de *Babesia* spp. as amostras cujos exames microscópicos revelaram a presença de formas intra-eritrocíticas típicas do gênero nos esfregaços sanguíneos.

Desta forma, no período de realização do estudo, foram identificados um total de 43 isolados de *Babesia* spp. As lâminas dos esfregaços sanguíneos foram submetidas, posteriormente, a avaliações morfométricas mais precisas.

As amostras de sangue positivas para *Babesia* spp. ao exame microscópico de triagem foram aliquotadas em tubos do tipo *Eppendorf* de 0,2mL, e destinadas ao processo de extração de DNA genômico.

4.3 Exames dos esfregaços sanguíneos

As lâminas dos esfregaços sanguíneos com resultados positivos ao exame de triagem foram submetidas à análise morfométrica minuciosa, conforme descrições morfológicas de referência para as espécies do gênero *Babesia* (SHORTT, 1973; KUTTLER, 1988; HOSKINS, 1991). As imagens das formas parasitárias sanguíneas foram capturadas e documentadas em câmara digital (*Sony DSC - S85 Cyber-shot*) acoplada a fotomicroscópio (*Axiostar plus – Zeiss*). Posteriormente, essas imagens foram avaliadas para realização de morfometria das estruturas. Foram medidas as formas intraeritrocitárias de *Babesia*, sendo que apenas as estruturas bem definidas morfolologicamente foram submetidas a morfometria. Estruturas amorfas ou atípicas não foram incluídas nessa avaliação. Para a morfometria foi utilizado o programa *Image J 1.37v* (National Institutes of Health – USA), calibrado especificamente para o microscópio utilizado para capturar as imagens (Objetiva 100X, Distância em *pixels* de 688 e 50 micrometros). As medidas obtidas foram classificadas em tabela de Excel para obtenção dos valores das amostras.

4.4 Extração do DNA genômico dos isolados

As amostras de sangue dos 43 isolados de *Babesia* spp. foram submetidas ao processo de extração de DNA por meio de *kit* comercial (*GFX-Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences®*). As etapas de extração foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante,

estabelecendo-se o volume de 100µL para a execução do processo em todas as amostras.

O eluato obtido no final da extração foi armazenado a -20 °C, em tubos do tipo *Eppendorf* de 0,2mL, em alíquotas de 25µL.

4.5 Construção dos iniciadores de PCR

Para a seleção de oligonucleotídeos iniciadores foram, a princípio, recuperadas sequências de referência para espécies do gênero *Babesia*, disponíveis no banco de dados do GenBank, pelo acesso *on line* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Dessa forma, foram obtidas as sequências correspondentes ao gene 18S RNAr de *B. canis canis* (acesso número AY072926), *B. canis rossi* (AY072925), *B. gibsoni* (AF231350), *B. bovis* (L31922), *B. bigemina* (X59604) e *B. equi* (Z15105) e as sequências correspondentes à extremidade 3' do gene 18S RNAr, ao espaço transcrito 1 (ITS1), ao gene 5,8S RNAr, ao ITS2 e à região da extremidade 5' do gene 28S RNAr das subespécies *B. canis canis* (AF394533), *B. canis vogeli* (AF394534) e *B. canis rossi* (AF394535).

As sequências foram identificadas, copiadas em arquivo digital, editadas no modelo *fasta* e submetidas ao alinhamento genético pelo método de *Clustal W* (THOMPSON, et al., 1976), empregando-se o *software* Megalin (*Megalign/LaserGen Navigator*. DNASTar, Inc.).

Os alinhamentos foram impressos em papel ofício e a seleção dos iniciadores foi realizada a partir de regiões conservadas dos genes (para iniciadores genéricos) e de áreas não conservadas ou semi-conservadas (para iniciadores espécie ou subespécie-específicos), de acordo com LISBY (1999) e UNIVERSITY OF NEBRASKA (2006).

As sequências selecionadas foram, então, submetidas a avaliação da especificidade pela análise de homologia, realizado por meio da operação de BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990), disponível no *GenBank*. As sequências que apresentaram resultados satisfatórios, quanto à

especificidade, foram encaminhadas para a síntese dos oligonucleotídeos em empresa do ramo (Invitrogen do Brasil).

Dessa forma foram construídos três iniciadores anti-senso (*reverse*) subespécie-específicos, designados de BAB3 (*B. c. canis*), BAB4 (*B. c. vogeli*) e BAB5 (*B. c. rossi*) e um iniciador senso (*forward*) gênero-específico designado BAB1.

4.6 Ensaios de PCR

A preparação do *mix* das reações subespécie-específicas de PCR e as condições de amplificação foram estabelecidas a partir de adaptações dos protocolos descritos por LINHARES et al. (2002) e otimizadas, segundo PERSING (1993). Foi, portanto, estabelecido o volume de 50µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*PCR buffer 10X Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50 mM (*Invitrogen*); 1µL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µl (10 pM) do iniciador *forward*, 0, 5 µL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 5 µL do DNA genômico da amostra.

Para as reações subespécie-específicas foram empregados os pares de iniciadores BAB1/BAB3 para *B. c. canis*, BAB1/BAB4 para *B. c. vogeli* e BAB1/BAB5 para *B. c. rossi*.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado para um ciclo inicial (*hot start*) de 94 °C por 2 min., seguido de 35 ciclos repetidos de 94 °C por 30 seg., temperatura de anelamento (Ta) por 30 seg. e 72 °C por 1 min. A programação era finalizada com 2 min. a 72 °C para maximizar o processo de extensão. A Ta era variável para cada par de iniciadores e calculada em função da quantidade de cada tipo de base nitrogenada contidas nos iniciadores, conforme OGLIARI et al. (2000).

Os testes de PCR para *B. gibsoni* foram realizados empregando-se iniciadores e protocolo, segundo INOKUMA et al. (2004) e, para *B. equi*, os iniciadores e protocolo descritos por BASHIRUDDIN et al. (1999).

4.7 Controles para as reações de PCR

Nos testes foram incluídos controles positivo e negativo. Como controle de especificidade foram utilizadas amostras de referência do DNA genômico de *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* e *B. gibsoni*.

Essas amostras de DNA de referência foram procedentes do Instituto de Parasitologia Comparada e Medicina Tropical da Universidade Ludwig Maximilian da Alemanha, gentilmente cedidas pelo Dr Livio Martins Costa Junior. A amostra

de DNA de *B. canis vogeli* utilizada havia sido previamente caracterizada por método filogenético e representava um isolado obtido de cão, naturalmente infectado, oriundo do Estado de Minas Gerais.

O controle positivo de referência para *B. equi* foi cedido pela Prof. Rosangela Zacarias (UNESP de Jaboticabal) e os controles para *E. canis*, *H. canis* e *M. haemocanis* foram provenientes do Banco de DNA Genômico de Hemoparasitos do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da EV/UFG.

Como controle negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada, livre de DNases e RNases (*DNase/RNase-Free Destilled Water, Invitrogen*).

4.8 Determinação da especificidade dos novos iniciadores

A identidade dos iniciadores foi previamente comprovada pela análise de homologia, executada pela operação BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Os *primers* foram testados pela utilização do BLAST.

As avaliações *in vitro* da especificidade para os novos iniciadores (BAB1, BAB3, BAB4 e BAB5) foram realizadas com a aplicação de ensaios de PCR, com as amostras de referência de DNA disponíveis para cada espécie ou subespécie, conforme item anterior.

Para as avaliações foram considerados os respectivos níveis de especificidade, esperado para cada par de iniciadores: BAB01/BAB03 (*B. c. canis*); BAB01/BAB04 (*B. c. vogeli*) e BAB01/BAB05 (*B. c. rossii*).

4.9 - Determinação e avaliação da sensibilidade das reações

Para estabelecer o limiar de sensibilidade dos ensaios de PCR propostos neste trabalho, foram realizados testes com diluições seriadas (de 10^{-1} a 10^{-12}) a partir do DNA genômico extraído de amostra de sangue com parasitemia previamente estimada, conforme READ & HYDE (1993).

A concentração de parasitos para as diluições seriadas foi determinada em função dos valores referentes à parasitemia (0,15%) e à contagem de

hemácias por mm^3 (2.090.000), previamente determinados para o isolado de *B. c. vogeli* de número 9. As concentrações para as respectivas diluições foram expressas em função do número de hemácias infectadas/5 μL . Optou-se por padronizar o cálculo da concentração em volume de 5 μL para coincidir com o volume do eluato de DNA genômico estabelecido no protocolo de preparação do *mix* de PCR, conforme item 4.7.

4.10 Leitura das reações de PCR

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente inoculados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – *Amersham Biosciences*) em tampão TBE1x.

Volume de 10 μL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 μL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 025% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) foram inoculados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100pb* (*Invitrogen*).

As eletroforeses foram conduzidas em cuba (*Horizon 11.14, Life Technologies*) ligada à fonte (250 EX, *Gibco EBRL*), programada para corrida a 90V, durante 60 minutos.

Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 $\mu\text{g/mL}$) por 10 min e descorados em água destilada por 5 min. A visualização foi feita pela utilização do aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*), em ambiente escuro.

A documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (*Vilber Lourmat*) e armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (*PhotoCapt, Viber Lourmat*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica de isolados de *Babesia* spp.

O estudo morfométrico das formas pareadas intra-eritrocitárias, presentes nos esfregaços sanguíneos dos 43 isolados, revelou médias de dimensões que variaram entre 1,33µm a 2,75µm para a largura e entre 2,15µm a 4,5µm para o comprimento (TABELA 1).

A análise comparativa dos resultados referentes à largura e ao comprimento das formas intraeritrocíticas pareadas dos isolados com os dados da literatura para *B. canis*, revelou dimensões inferiores àquelas documentadas tanto por KUTTLER (1988) quanto por HOSKINS (1991). No entanto quatro desses isolados (nº 07, 16, 21, 31) apresentaram médias correspondentes estes valores de referência para *B. canis*.

Com exceção do isolado nº 17, os demais apresentaram outras características morfológicas semelhantes à *B. canis*, formando um ou mais pares intra-eritrocitários, conforme documentado por KUTTLER (1988), HOSKINS (1991), MASSARD & O'DWYER (2002). Foram observadas também formas ovais, alongadas ou amebóides, como descrito por SHORTT (1973) para a espécie *B. canis*.

Apesar da maior semelhança dos isolados com a espécie *B. canis*, foram observados alguns corpos intra-eritrocitários isolados e arredondados no esfregaço do isolado nº 17, com morfologia e dimensões próximo dos parâmetros atribuídos à *B. gibsoni*, as estruturas avaliadas desse isolado variaram entre 1,53µm x 2,24µm à 2,01µm x 2,90µm enquanto os valores para a espécie apresentam medidas de 1,2µm x 1,9µm (KUTTLER, 1988) e 1,0µm x 3,2µm (HOSKINS, 1991).

A babesiose canina é, geralmente, atribuída a organismos do grupo das grandes (*B. canis*) ou pequenas (*B. gibsoni*) babesias. Na rotina, o diagnóstico laboratorial fundamenta-se na avaliação do tamanho e morfologia das formas intra-eritrocíticas. Entretanto, como a situação envolvendo a taxonomia das espécies de *Babesia* de origem canina não se encontra totalmente definida, o

diagnóstico definitivo com base nestes critérios podem ser questionados (PASSOS et al., 2005) já que pode levar a interpretações equivocadas. Trabalhos recentes, têm demonstrando a infecção de cães por outras espécies pequenas como *B. equi* (CRIADO-FORNELIO et al., 2004), *B. microti-like* (ZAHLER et al., 2000; CAMACHO et al., 2001); *B. conradae* (KJEMTRUP & CONRAD., 2006); assim como, outras espécies que se enquadram dentro do grupo das grandes babesias (BIRKENHEUER et al., 2004).

Outro fator a ser considerado é a referência de alguns autores em relação à sintomatologia provocada pelas subespécies de *B. canis*. De acordo com UILENBERG et al (1989) e SCHETTERS et al (1997) a patogenicidade para *B. c. vogeli* é moderada em alguns momentos inaparente, entretanto isso não foi observado em todos os cães do nosso estudo, já que alguns animais apresentavam sinais clínicos mais severos.

Essa situação tem motivado, cada vez mais, o uso, de técnicas de biologia molecular em estudos envolvendo a etiologia e a epidemiologia da babesiose canina.

Tabela 1: Medidas de merozoítos intra-eritrocitários em esfregaços sanguíneos de isolados de *Babesia* sp. de cães procedentes da cidade de Goiânia, GO.

| Isolados | Média do isolado largura (µm) | Valor min/max largura (µm) | Média do isolado comprimento (µm) | Valor mín/max comprimento (µm) |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| 2 | 1,71 (n=22) | 1,16/2,34 | 2,60 (n=22) | 1,67/3,48 |
| 3 | 1,75 (n=2) | 1,39/2,11 | 2,15 (n=2) | 2,11/2,18 |
| 6 | 1,91 (n=2) | 1,71/2,11 | 2,96 (n=2) | 2,64/3,28 |
| 7 | 2,28 (n=6) | 1,67/2,70 | 3,43 (n=6) | 2,12/4,14 |
| 9 | 1,58 (n=4) | 1,35/1,79 | 2,34 (n=4) | 2,27/2,38 |
| 11 | 1,79 (n=14) | 1,43/2,44 | 2,47 (n=14) | 2,04/3,46 |
| 12 | 1,82 (n=6) | 1,57/2,03 | 2,94 (n=6) | 2,47/3,31 |
| 16 | 2,75 (n=2) | 2,63/2,87 | 3,47 (n=2) | 3,15/3,80 |
| 19 | 1,68 (n=2) | 1,60/1,75 | 3,19 (n=2) | 3,13/3,25 |
| 20 | 1,44 (n=10) | 1,01/1,95 | 2,52 (n=10) | 2,18/3,00 |
| 21 | 2,64 (n=2) | 2,48/2,79 | 4,50 (n=2) | 4,27/4,73 |
| 23 | 1,81 (n=4) | 1,49/2,05 | 2,24 (n=4) | 1,90/2,77 |
| 31 | 2,52 (n=4) | 2,19/2,68 | 3,76 (n=4) | 2,55/4,82 |
| 32 | 2,09 (n=6) | 1,51/2,48 | 3,13 (n=6) | 2,70/3,68 |
| 33 | 1,56 (n=4) | 1,09/1,85 | 2,21 (n=4) | 1,75/2,69 |
| 34 | 1,33 (n=2) | 1,27/1,38 | 2,45 (n=2) | 2,19/2,70 |
| 36 | 1,74 (n=4) | 1,35/2,05 | 2,70 (n=4) | 2,39/3,17 |
| 37 | 1,79 (n=22) | 1,37/2,25 | 3,34 (n=22) | 2,39/4,35 |
| 40 | 1,68 (n=2) | 1,60/1,75 | 2,80(n=2) | 2,77/2,83 |
| 41 | 1,75 (n=10) | 1,45/2,03 | 2,32 (n=10) | 2,34/3,95 |
| 43 | 1, 81(n=4) | 1,44/2,08 | 2,99 (n=4) | 1,98/3,99 |

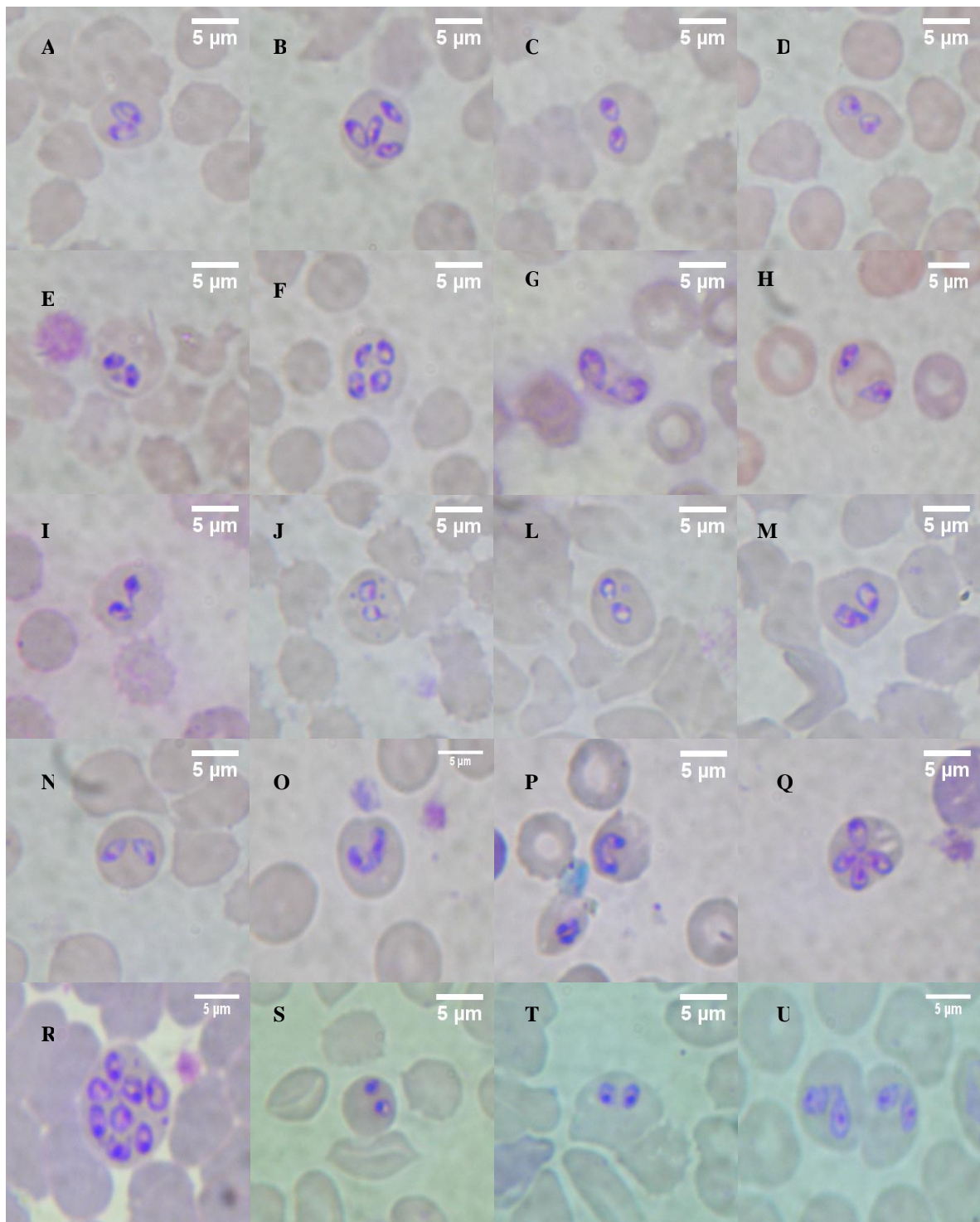


Figura 1 : Formas intra-eritrocíticas pareadas de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos de cães anêmicos, procedentes da cidade de Goiânia, Goiás. **A à D**: isolado 02, **E**: isolado 03, **F**: isolado 04, **G e H**: isolado 07, **I**: isolado 09, **J e L**: isolado 11, **M e N**: isolado 12, **O**: isolado 19, **P e Q**: isolado 20, **R**: isolado 32, **S**: isolado 33, **T**: isolado 34, **U**: isolado 37.

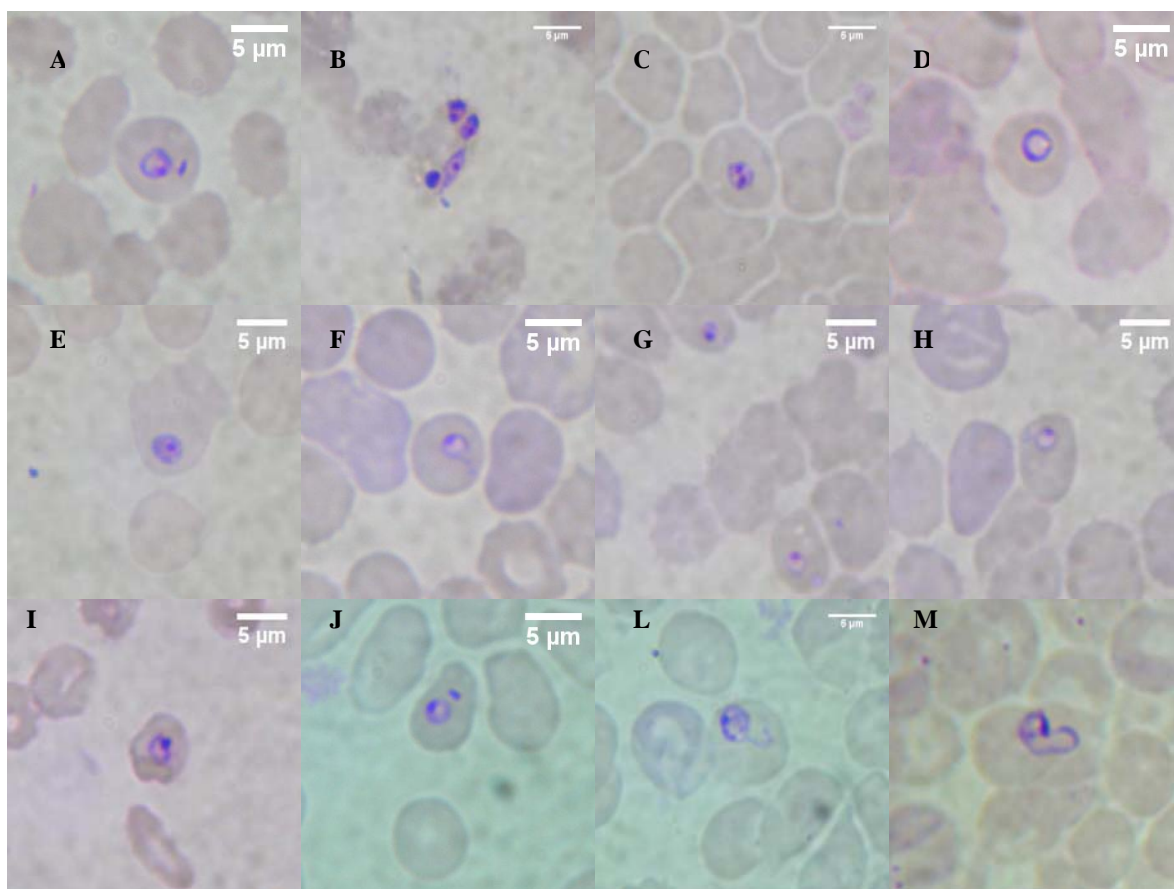


Figura 2 : Formas intra-eritrocíticas arredondadas e amebóides de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos de cães anêmicos, procedentes da cidade de Goiânia, Goiás. **A:** isolado 02, **B:** isolado 06, **C:** isolado 13, **D e E:** isolado 15, **F, G e H:** isolado 17, **I:** isolado 23, **J:** isolado 33, **L:** isolado 34, **M:** isolado 38.

5.2 Construção de iniciadores gênero e subespécie-específicos

Do alinhamento das seqüências do gene 18S RNAr, correspondentes às subespécies *B. canis canis* (acesso GenBank AY072926), *B. canis rossi* (AY072925) e às espécies *B. gibsoni* (AF231350), *B. bovis* (L31922), *B. bigemina* (X59604) e *B. equi* (Z15105) foi selecionado o iniciador BAB1 *forward*, gênero-específico, de 21 bases nitrogenadas, localizado em uma região conservada, entre as posições 1932-1952 do alinhamento (FIGURA 3). A temperatura de anelamento (Ta) para este oligo foi calculada em 57 °C. A seqüência deste iniciador consta no QUADRO 1.

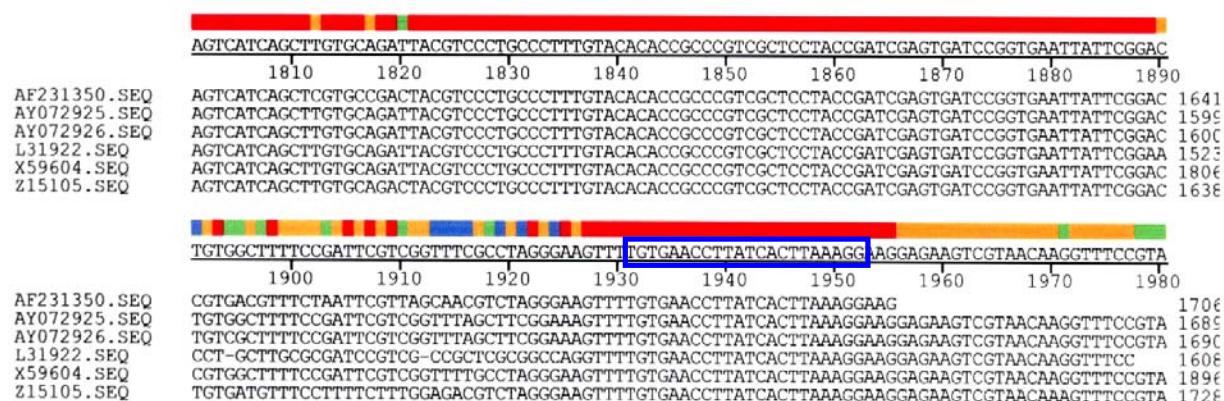


FIGURA 3 - Alinhamento do gene 18S RNAr de *B. canis canis* (acesso GenBank AY072926), *B. canis rossi* (AY072925), *B. gibsoni* (AF231350), *B. bovis* (L31922), *B. bigemina* (X59604) e *B. equi* (Z15105), com localização do iniciador *forward* genérico BAB1.

QUADRO 1 - Iniciadores selecionados para a amplificação de fragmentos de sequências localizadas entre os genes 18S RNAr e 28S RNAr de *B. canis*, pela PCR.

| nº de acesso no <i>GenBank</i> | Oligo | Sequências | Posição no gene | T _a (°C) |
|--------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------|---------------------|
| diversos | BAB1 | 5'-GTG AAC CTT ATC ACT TAA AGG-3' | variado | 57 |
| (AF394533) | BAB3 | 5'-CTA CAC AGA GCA CAC AGC C-3' | 732-714 | 55 |
| (AF394534) | BAB4 | 5'-CAA CTC CTC CAC GCA ATC G-3' | 586-568 | 55 |
| (AF394535) | BAB5 | 5'-AGG AGT TGC TTA CGC ACT CA-3' | 328-309 | 55 |

BAB1 = *forward* gênero-específico; **BAB3** = *reverse* subespécie-específico de *B. c. canis*; **BAB4** = *reverse* subespécie-específico de *B. c. vogeli*; **BAB5** = *reverse* subespécie-específico de *B. c. rossi*. Ta = temperatura de anelamento.

A partir do alinhamento das seqüências referentes aos genes 18S RNAr, 5,8S RNAr e 28S RNAr e aos espaços transcritos ITS1 e ITS2 das subespécies *B. canis canis* (AF394533), *B. canis vogeli* (AF394534) e *B. canis rossi* (AF394535), foram selecionados, três iniciadores anti-senso (*reverse*), subespécie-específicos, identificados como BAB3, BAB4 e BAB5 (FIGURA 4).

O iniciador BAB3, com 19 bases nitrogenadas, específico para a subespécie *B. c. canis*, foi selecionado de uma região não conservada, localizada na posição 752-732 do alinhamento (FIGURA 4), correspondente à posição 732-714 da seqüência AF394533 (QUADRO 1).

Para a subespécie *B. c. vogeli* foi selecionado o iniciador específico BAB4, composto de também de 19 bases nitrogenadas, localizado na posição 608-590 do alinhamento (FIGURA 4) e na 586-568 da seqüência AF 394534 (QUADRO 1).

O oligo BAB5, de 20 bases nitrogenadas foi selecionado como iniciador subespécie-específico para *B. c. rossi*, com localização definida entre as posições 348-327 do alinhamento (FIGURA 4) e entre 328-309 da seqüência AF394535 (QUADRO 1).

As seqüências dos iniciadores subespécie-específicos BAB3, BAB4 e BAB5, assim como as respectivas localizações nos genes e temperaturas de anelamento, foram discriminadas no QUADRO 1.

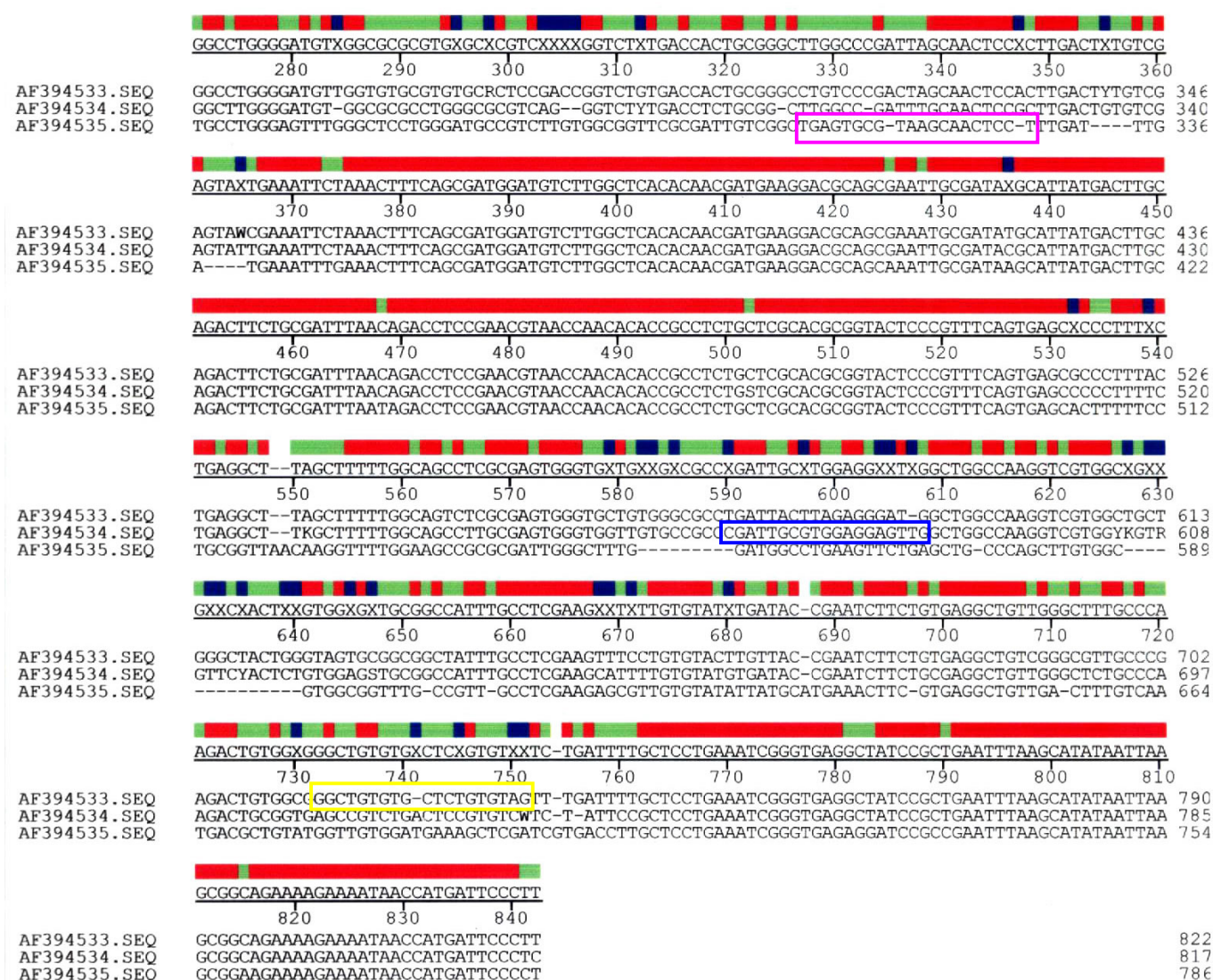


FIGURA 4 - Alinhamento de sequências localizadas entre a extremidade 3' do gene 18S RNAr e o 28S RNAr (inclusive 5,8S RNAr, ITS1 e ITS2) das subespécies *B. c. canis* (AF394533), *B. c. vogeli* (AF394534) e *B. c. rossi* (AF394535), com localização dos iniciadores BAB3, BAB4 e BAB5.

A análise de homologia pela operação de BLAST para o iniciador BAB3 apresentou resultado de máximo escore de identidade para a sequência AF394533 de *Babesia c. canis* sem homologia significativa para as demais subespécies ou espécies do gênero. O mesmo foi demonstrado nas análises

executadas para os iniciadores BAB4 e BAB5, os quais também demonstraram escores máximos de identidade para as respectivas sequências AF394534 (*B. c. vogeli*) e AF394535 (*B. c. rossi*).

Também, pelo BLAST, o oligo BAB1 foi caracterizado como um iniciador para as espécies do gênero *Babesia* e, ainda, para algumas espécies de gêneros próximos com *Theileria*, *Sarcocystis* e *Cytauxzoon*.

Com base nesses resultados, três combinações de pares de iniciadores foram estabelecidas com a finalidade de obter produtos de amplificação específicos. Neste sentido, foram definidos os pares BAB1/BAB3, BAB1/BAB4 e BAB1/BAB5, compostos, cada par, por um iniciador genérico e outro para subespécie, visando produtos de PCR específicos de *B. c. canis* (746pb), *B. c. vogeli* (590pb) e *B. c. rossi* (342pb) (QUADRO 2).

QUADRO 2 - Pares de iniciadores estabelecidos para a amplificação de fragmentos subespécies-específicos de sequências localizadas entre os genes 18S RNAr e 28S RNAr de *B. canis*, pela reação de PCR.

| Pares de oligos | Especificidade | Produtos de PCR |
|-----------------|---------------------|-----------------|
| BAB1/BAB3 | <i>B. c. canis</i> | 746 pb. |
| BAB1/BAB4 | <i>B. c. vogeli</i> | 590 pb. |
| BAB1/BAB5 | <i>B. c. rossi</i> | 342 pb. |

5.3 Avaliação de especificidade dos ensaios de PCR

Os resultados dos testes de PCR, realizados com as três combinações de iniciadores (BAB1/BAB3, BAB1/BAB4 e BAB1/BAB5) comprovaram a especificidade para cada par, em reações frente às amostras de DNA de referência para os hemoparasitos *B. c. canis*, *B. c. vogeli*, *B. c. rossi*, *B. gibsoni*, *B. equi*, *E. canis*, *H. canis* e *M. haemocanis*, e, ainda, DNA de *Canis familiaris* livre de infecção (FIGURAS 5, 6 e 7).

O par de iniciadores BAB1/BAB3 amplificou o fragmento-alvo esperado de 746 pb, correspondente à sequência de 746pb localizada entre a extremidade 3' do gene 18S RNAr e o gene 28S RNAr de *B. c. canis* (FIGURA 5).

Para os pares BAB1/BAB4 e BAB1/BAB5 foram registradas amplificações dos fragmentos-alvo esperados de 590pb (FIGURA 6) e 342pb (FIGURA 7), localizados entre a extremidade 3' do gene 18S RNAr e o gene 28S RNAr de *B. c. vogeli* e *B. c. rossi*, respectivamente.

Os resultados alcançados com os testes de especificidade deram suporte para validar os ensaios de PCR com os pares de iniciadores propostos neste estudo, como protocolos confiáveis para amplificações subespécie-específicas por PCR para *B. c. canis*, *B. c. vogeli* e *B. c. rossi*. Ficou também comprovada a ausência de amplificações cruzadas ou inespecíficas entre as diferentes sub-espécies de *B. canis*, entre outros hemoparasitos de cães, ou mesmo o DNA do próprio hospedeiro. Nos ensaios de PCR nenhum dos testes apresentou amplificação dos controles negativos, demonstrando a ausência de contaminação com a manipulação do ácido nucléico das diferentes amostras.

A aplicação dos ensaios de PCR, aqui propostos, torna possível a identificação das subespécies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* em uma reação única de PCR, permitindo maior precisão no esclarecimento sobre o agente envolvido nas infecções e disponibilizando uma ferramenta importante para estudos de epidemiologia molecular.

Até a presente data não havia sido divulgado nenhum ensaio de PCR com iniciadores capazes de discriminar as subespécies de *B. canis*. Para esta diferenciação os métodos disponíveis, encontrados na literatura científica, referiam-se a de análise de polimorfismo ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) de produto da amplificação gênero-específica por PCR (ZÄHLER et al., 1998; DE SÁ et al., 2006), ou o sequenciamento de produtos de PCR (UILENBERG et al., 1989; CARRET et al., 1999; CACCIO et al., 2002; INOKUMA et al., 2004; FOLDVARI et al., 2005; PASSOS et al., 2005; OYAMADA et al., 2005; GULANBER et al., 2006).

Portanto, os ensaios de PCR apresentados e validados neste estudo, preencheram as expectativas iniciais do trabalho, disponibilizando métodos de diagnóstico molecular, em nível de subespécie de *B. canis*, com vantagens quanto ao custo, rapidez e praticidade na execução, quando comparados aos demais métodos moleculares até então publicados.

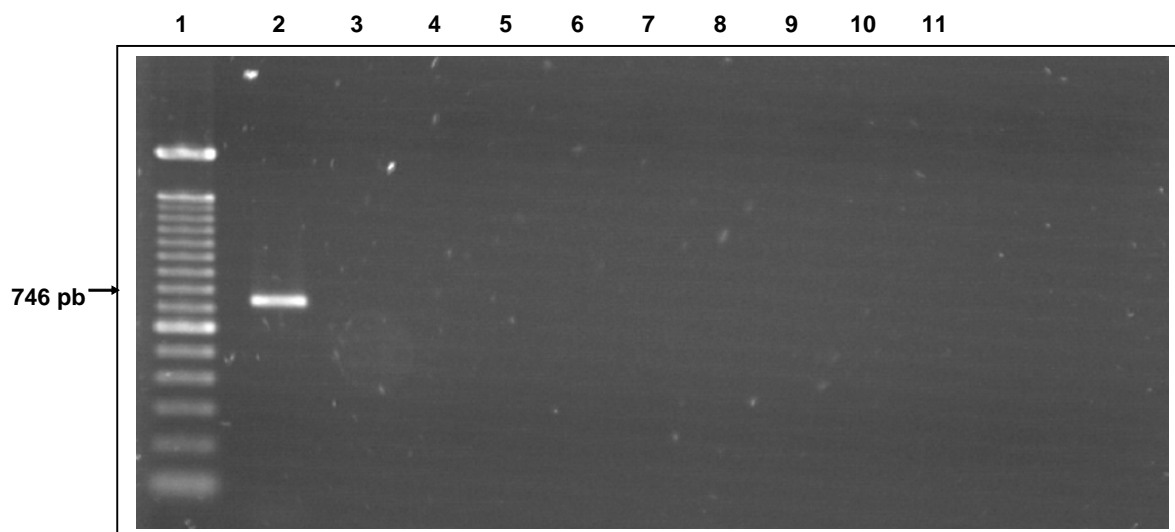


FIGURA 5- Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores *B. c. canis*-específico, BAB1/BAB3: **1-** marcador de 100 pb; **2-** DNA de *B. canis canis*; **3-** DNA de *B. canis vogeli*; **4-** DNA de *B. canis rossi*; **5-** DNA de *E. canis*, **6-** DNA de *H. canis*, **7-** DNA de *M. haemocanis*, **8-** DNA de *B. equi*, **9-** DNA de *B. gibsoni*, **10-** DNA de cão livre de infecção, **11** - controle negativo.

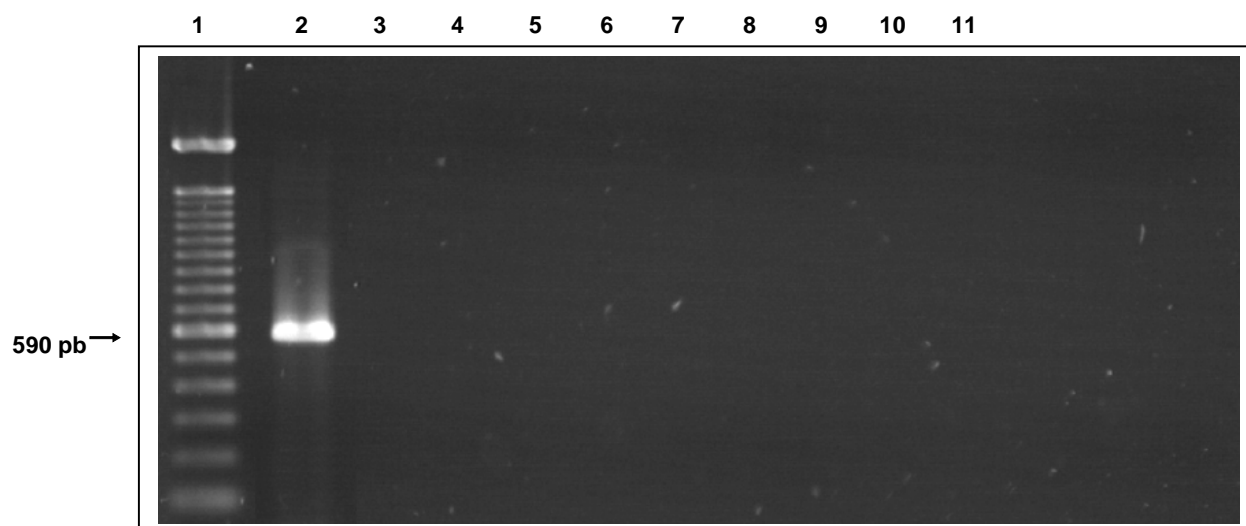


FIGURA 6- Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores *B. c. vogeli*-específico: BAB1/BAB4 **1-** marcador de 100 pb; **2-** DNA de *B. canis vogeli*; **3-** DNA de *B. canis canis*, **4-** DNA de *B. canis rossi*; **5-** DNA de *E. canis*, **6-**

DNA de *H. canis*, 7- DNA de *M. haemocanis*, 8- DNA de *B. equi*, 9- DNA de *B. gibsoni*, 10- DNA de cão livre de infecção, 11 - controle negativo.

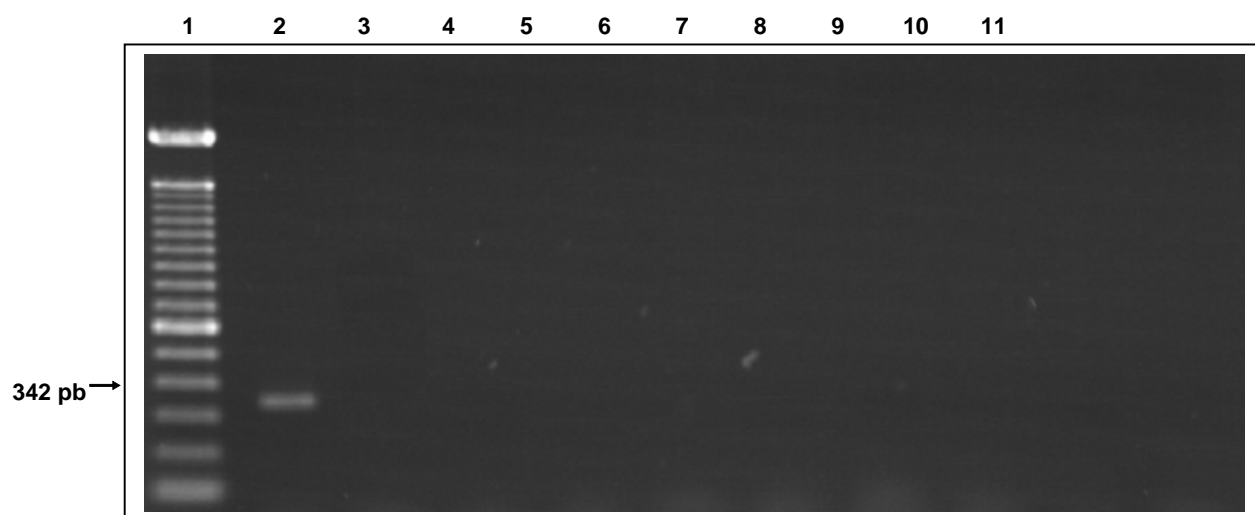


FIGURA 7- Eletroforese referente ao teste de especificidade do ensaio de PCR com o par de iniciadores *B. c. rossii*-específico: BAB1/BAB5 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *B. canis rossii*; 3- DNA de *B. canis canis*, 4- DNA de *B. canis vogeli*; 5- DNA de *E. canis*, 6- DNA de *H. canis*, 7- DNA de *M. haemocanis*, 8- DNA de *B. equi*, 9- DNA de *B. gibsoni*, 10- DNA de cão livre de infecção, 11 - controle negativo.

5.4 Avaliação da sensibilidade dos ensaios de PCR

Os testes realizados para avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR proposto para a detecção específica de *B. c. vogeli*, apresentaram resultados que comprovaram a habilidade do método para detectar uma concentração mínima de parasito equivalente a uma hemácia infectada/amostra de DNA submetida ao teste de PCR. Foram igualmente positivas as amostras correspondentes a concentrações maiores de parasitos, estimadas em 15.675, 1.567, 156 e 15 hemácias infectadas (FIGURA 8).

Esses resultados corroboram com publicações anteriores, demonstrando o nível de sensibilidade da técnica de PCR capaz de detectar um único protozoário na amostra (FAHRIMAL et al., 1992, NICKEL et al., 2001). Resultados semelhantes foram reportados por JEFFERIES et al. (2003) em ensaios de PCR para a detecção gênero-específica de *Babesia* sp. de origem canina, na Austrália. Sensibilidade ligeiramente inferior (10 hemácias infectadas) foi relatada por INOKUMA et al. (2004), em ensaios de PCR espécie-específico, tanto para *B. canis* quanto para *B. gibsoni*. ANO et al. (2001), apresentaram um ensaio de *nested*-PCR específico para *B. gibsoni*, cuja sensibilidade também foi estimada em, aproximadamente, 10 hemácias infectadas.

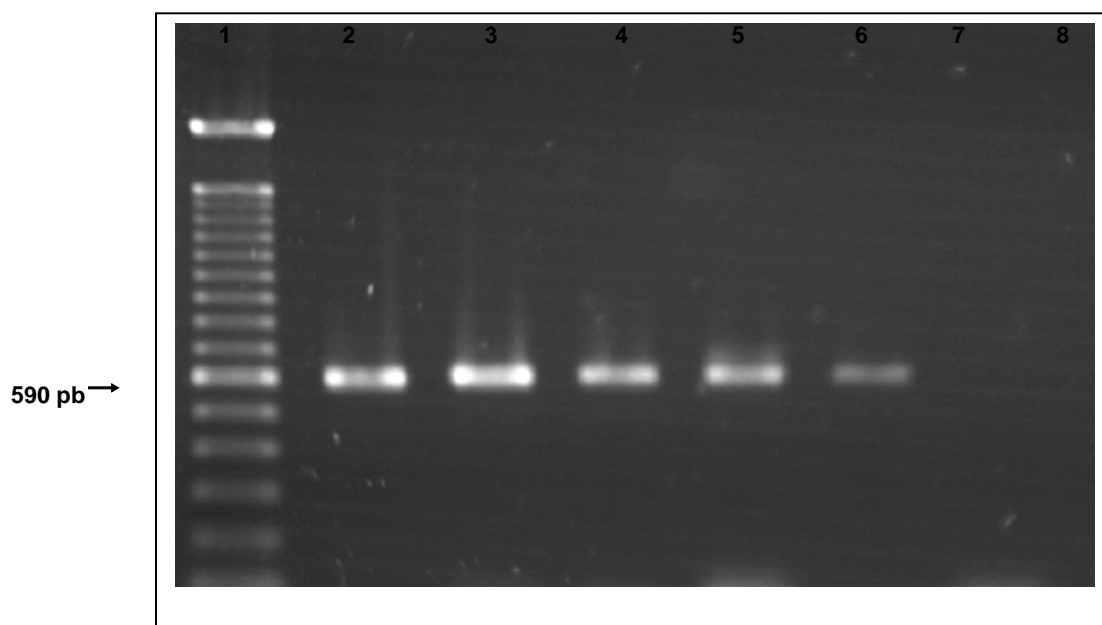


FIGURA 8. Eletroforese dos fragmentos de 590pb amplificados por PCR com o par iniciador BAB1/BAB4, a partir de diferentes concentrações de hemácias infectadas por *B. c. vogeli*: 1- Marcador de 100pb; 2- 15.675 hemácias infectadas; 3- 1.567 hemácias infectadas; 4- 156 hemácias infectadas; 5-15 hemácias infectadas; 6- uma hemácia infectada; 7- nenhuma hemácia infectada; 8- Controle negativo.

5.5 Caracterização molecular de isolados de *Babesia* spp.

As 43 amostras submetidas à técnica de PCR utilizando-se o par de iniciadores BAB1/BAB3, subespécie-específico para *B. c. canis*, apresentaram resultados negativos. O controle positivo (DNA de referência para *B. c. canis*) proporcionou amplificação do fragmento-alvo de 746 pb e o controle negativo funcionou adequadamente.

As mesmas amostras, quando testadas pela reação de PCR com o par de iniciadores BAB1/BAB4, subespécie-específico para *B. c. vogeli*, foram 100% (n=43) positivas, amplificando o fragmento-alvo esperado de 590 pb. O controle positivo (DNA de referência para *B. c. vogeli*) também proporcionou amplificação do mesmo produto de PCR e o controle negativo não gerou nenhuma amplificação. Os resultados dos testes de PCR que confirmaram a identidade molecular dos isolados de *B. c. vogeli*, para as amostras de números 1 a 10, foram documentadas na FIGURA 9.

Nos testes de PCR em que foram empregados o par de iniciadores BAB1/BAB5, subespécie-específico para *B. c. rossi*, o resultado foi negativo para todas as 43 amostras testadas e para o controle negativo. O controle positivo (DNA de referência para *B. c. rossi*) gerou o produto de PCR esperado, de 342 pb.

Os resultados obtidos com a aplicação dos testes de PCR espécie-específicos, tanto para *B. gibsoni* (INOKUMA et al., 2004) quanto para *B. equi* (BASHIRUDDIN et al., 1999) foram negativos para as 43 amostras avaliadas neste estudo. Em ambos, os controles positivos de referência para cada espécie deram origem a produtos de amplificação específicos de 665pb e 664pb, respectivamente, nas reações com os iniciadores GIB599/GIB1270 para *B. gibsoni* e com os iniciadores BEQ1/BEQ2 para *B. equi*.

A *B. c. vogeli* foi observada utilizando técnicas moleculares na Europa (ZÄHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; CACCIÒ et al., 2002; CRIADO-FORNELIO et al., 2003), Norte e Sul da África (ZÄHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999) Ásia (INOKUMA et al., 2003), Austrália (JEFFERIES et al., 2003), América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2003), Brasil (PASSOS et al., 2005, DE

SÁ et al., 2006), Sudão (OYAMADA et al., 2005) e Turquia (GULANBER et al., 2006).

A distribuição do agente está diretamente relacionada com a localização de seu carrapato vetor, o *R. sanguineus* (RISTIC, 1988). As mudanças climáticas atuais que acarretam aumento da temperatura global favorecem a disseminação desses vetores, aumentando a prevalência da enfermidade no Brasil e no mundo. O clima da região Centro-Oeste é extremamente favorável a esse ácaro possibilitando a infestação dos cães com carrapatos durante todo o ano (LOULY, 2002).

Dessa forma, estudos que possam esclarecer o envolvimento dos agentes responsáveis pela enfermidade são de fundamental importância.

No Brasil foram realizados dois estudos com identificação de *B. c. vogeli*. O primeiro, por PASSOS et al (2005) trabalhando com quatro amostras oriundas do estado de Minas Gerais e uma amostra proveniente de um cão do estado de São Paulo. O segundo, por DE SÁ et al (2006) em estudo com RFLP-PCR com amostras do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos em nosso trabalho corroboram os encontrados por estes pesquisadores.

Existe ainda uma publicação recente de TRAPP et al (2006) que encontraram pela amplificação do gene SSU rRNA e análise por sequenciamento a espécie *B. gibsoni*, no Brasil, que até então só havia sido relatada por identificação morfológica por BRACCINI et al., (1992).

Existem pesquisadores que já consideram a *B. c. canis*, *B. c. vogeli* e *B. c. rossi* como espécies distintas e as classificam separadamente como *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* respectivamente (PASSOS et al., 2005; GULANBER et al., 2006, TRAPP et al., 2006). Essa classificação foi proposta devido a variabilidade de vetores e avaliação das diferenças entre essas subespécies observadas por métodos moleculares (ZAHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; CACCIÒ et al., 2002). Entretanto, como ainda não houve consenso geral sobre o assunto, este trabalho vai se ater a nomenclatura proposta anteriormente (UILENBERG et al., 1989).

Há evidências de variabilidade antigênica e genética entre as subespécies de *B. canis* nas diferentes regiões geográficas (ZAHLER et al., 1998). Entretanto, no Brasil, ainda existem poucos estudos que disponibilizem essas informações considerando a grande extensão territorial.

O presente estudo aponta a necessidade de novas pesquisas para identificação das espécies de *Babesia* presentes no Brasil, bem como as diferenças genéticas que possam haver entre os isolados e sua implicação em áreas como imunologia, patologia e epidemiologia molecular.

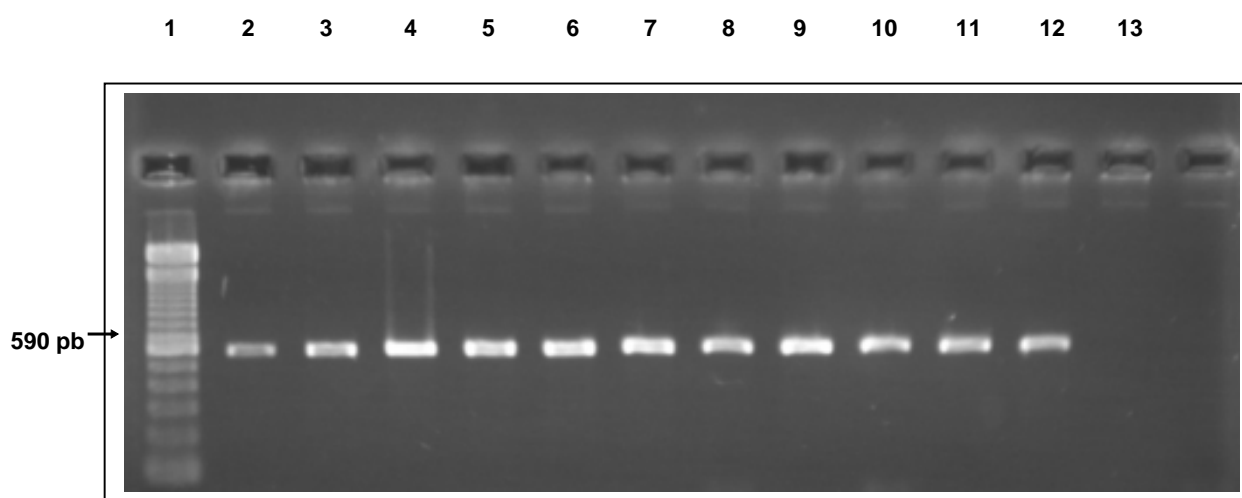


FIGURA 9- Eletroforese de produtos de 590 pb de *B. c. vogeli* obtidos pela PCR com o par de iniciadores BAB1/BAB4. **1-** marcador de 100 pb; **2 a 11-** Isolados de números 1 a 10; **12-** controle positivo; **13-** controle negativo.

6- CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

Os novos pares de *primers* BAB01/BAB03, BAB01/BAB04 e BAB01/05 amplificam fragmentos subespécie-específicos de 746 pb, 590 pb e 342 pb, localizados entre a extremidade 3' do gene 18S RNAr e o gene 28S RNAr de *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, respectivamente, pela técnica de PCR.

As formas intra-eritrocitárias de hemoparasitos presentes nos esfregaços sanguíneos de isolados de *Babesia* sp. em cães procedentes de Goiânia, apresentam características morfométricas semelhantes à espécie *B. canis lato sensu*.

Os isolados de *Babesia* sp. procedentes de cães da cidade de Goiânia são identificados como subespécie *B. canis. vogeli stricto sensu*, pela reação de PCR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A., RUIZ, L., AMUSATEUGUI, I., SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 53, n.4, p. 197-200. 2006.
2. ALENCAR, N.X., KOHAYAGAWA, A., SANTAREM, V.A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.70, p.279-282, 1997.
3. ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1º edição Rio de Janeiro: L.F. livros de Veterinária Ltda, 2002. 135p.
4. ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
5. ALVES, L.M., LINHARES, G.F.C., CHAVES, N.S.T., MONTEIRO, L.C., LINHARES, D.C.L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. v. 6, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2005.
6. ANDEREG, I. P.; PASSOS, F. M. L Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 18, p. 31-38, 1999.
7. ANO, H; MAKIMURA, S; HARASAWA, R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polimerase chain reaction. **Clinical Pathology**. v.63, n.1, p. 111-113, 2001.
8. BANETH, G, MATHEW, J.S, SHKAP, V, MACINTIRE, D, BARTA, J.R, EWING, J.A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitology** v.19 n.1, 2003.
9. BASHIRUDDIN, J.B., CAMMÀB, C., REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v.84, p. 75-83, 1999.
10. BASTOS, C.V., MOREIRA, S.M., PASSOS, L.M.F. **Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil** . **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1026, p.158, 2004.
11. BICHARD, J. S.; SHERDING, G. R. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 139-143.

12. BIRKENHEUER, A.J., LEVY, M.G., BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p.4172–4177, 2003.
13. 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**. v. 124, p. 151-160. 2004.
14. BOSE, R, JORGENSEN, W.K, DALGLIESH, R.J, FRIEDHOFF, K.T, DE VOS, A..J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**. n.57, p 61-74, 1995.
15. 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 Veterinária, UFRGS**, v.20, p.134–149, 1992.
16. BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C.(Ed.):**Textbook of veterinary internal medicine**.5.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, v.1, cap.86, p.400-407. 2000.
17. BROWN, G.K., CANFIELD, P.J., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K., MARTIN, A.R., BROWN, C.S., IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Australian Veterinary Journal**. v.84, n.9, p. 321-325. 2006.
18. CACCIO, S.M., ANTUNOVIC, B., MORETTI, A., MANGILI, A., MARINCULIC,A., BARIC, R.R., SLEMENDA, S.B., PIENIAZEK, N.J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary. Parasitology**., v.106, p.285–292, 2002.
19. CAMACHO, A.T.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; GUITIÁN, F.J.; OLMEDA, A.S.; GOETHERT, H.K.; TELFORD, S.R. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **The Veterinary Record**. v.3, p. 552-555. 2001.
20. CARRET, C., WALAS, F., CAREY, 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 Eucariotic. Microbiology**., v.46, p.298–303, 1999.
21. CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2º edição. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 843 p.

22. COSTA, J.O.; BATISTA JUNIOR, J.A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia da UFMG**, n. 25, p. 199-200, 1973.
23. CRIADO-FORNELIO, A.C.; GONZALES DEL RIO, M.A.; SARANA, A.B.; CARRETERO, J.C.B. The expanding universe of piroplasms. **Veterinary Parasitology**. v. 119, p. 337-345. 2004.
24. CRIADO-FORNELIO, J. L. RUAS, N. CASADO, N. A. R. FARIAS, M. P. SOARES, G. MOLLERT, J. G. W. BRUM, M. E. A. BERNET, A. BULINGSARAFIAT, AND J. C. BARBA-CARRETERO. New molecular data on mammalian *hepatozoon* species (apicomplexa: adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal Parasitology**, v. 92, n.1, p. 93-99, 2006.
25. DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**. v. 141, p. 197-203. 2006.
26. DELL'PORTO, A., OLIVEIRA, M.R., MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.2, p. 37-40, 1993.
27. DE SÁ, A.G; CERQUEIRA, A.M.F; O'DWYER, L.H; MACIEIRA, D.B; ABREU, F.S; FERREIRA, R.F; PEREIRA, A.M; VELHO, P.B; ALMOSNY, N.R.P. Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* From Naturally Infected Brazilian Dogs. **International Journal Applied Research Veterinary Medicine** • Vol. 4, No. 2, 2006.
28. DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; Rurangirwa, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. San Francisco: High **Wire Press**, v. 51, pt. 6, p. 2145-2165, 2001.
29. FAHRIMAL, Y., GOFF, W.L., JASMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.6, p.1374-1379. 1992.
30. FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed.) **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
31. FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K.R., EWING, S.A., MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.134, p.1-7, 2005.

32. FOLDVARI, G; HELL,E; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**. v. 127, p. 221-226, 2005.
33. GARCIA-NAVARRO, C. E. K., PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela Ltda., 1998. 169p.
34. GONDIM, L.F.P; KOHAYAGAWA, A; ALENCAR, N.X; BIONDO, A.W; TAKAHIRA, R.K; FRANCO, S.R.V. Canine hepatozoonosis in Brasil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, n.74, p.319-323, 1998.
35. GOODGER, B.; WRIGHT, I.C. Pathogenesis of babesiosis In RISTIC,M. **Babesiosis of domestic animals as man**. Boca Raton: CRC Press, 1998, p.99–118.
36. GUIMARAES, A.M., OLIVEIRA, T.M.F.S., SANTA-ROSA, I.C.A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clinica. Veterinária**. v.41, p.60-68, 2002.
37. GUIMARAES, J. C; ALBERNAZ, A.P., MACHADO, J.A., JUNIOR, O.A.M., GARCIA, L.N.N. Aspectos clinico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13. p.229. 2004.
38. GUIMARAES, J.H., TUCKI, E.C., BARROS - BATTESTI, B. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Plêiade – Fapesp: São Paulo, 2001, 218p.
39. GÜLANBER, A., GORENFLOT, A., SCHETTERS, T.P.M., CARCY, B. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p.224-230, 2006.
40. HAGIWARA, M.K., BRANDÃO, L.P. Babesiose canina – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.7, n.41, p.50-59, 2002.
41. HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: Saunders Company, 1991, v.21, n.01, 201p.
42. HUANG, H., UNVER, A., PEREZ,M.J., ORELLANA,N.G. RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela, **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, n.3, p. 211-216. 2005.
43. INOKUMA, H., BEPPU, T., OKUDA, M., SHIMADA, Y, SAKATA,Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**. v. 115, n.4, p. 343-348, 2003.

44. INOKUMA, H., FUJII, K., MATSUMOTO, K., OKUDA, M., NAKAGOME, N., KOSUGI, R., HIRAKAWA, M., ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**. v. 110, p.145-152, 2002.
45. 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**. v. 121, p. 341-346. 2004.
46. JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
47. JEFFERIES, R; RYAN, U. M; MUHINICKEL, C. J; IRWINT, P. J. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. **Journal. Parasitology**. v. 89, n.2, p. 409-412, 2003.
48. KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária bioquímica clínica e hematologia**. São Paulo: Roca, 2003, 436p.
49. KJEMTRUP, A.M., KOCAN, A.A., WHITWORTH, L., MEINKOTH, J., BIRKENHEUER, A.J., CUMMINGS, J., BOUDREAUX, M.K., STOCKHAM, S.L., IRIZARRY-ROVIRA, A., CONRAD, P.A. There are least three genetically distinct small piroplasms from dogs. **International Journal of Parasitology**., v.30, n.14, p.1501-1505, 2000.
50. KJEMTRUP, A.M; CONRAD, P.A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Veterinary Parasitology**. v.138, p. 112-117. 2006.
51. KUTTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 1-22.
52. LABRUNA, M., PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**. v.11, p. 112-117, 2001.
53. LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1998. 152 p.
54. LINHARES, G.F.C., SANTANA, A.P, LAUEMAN, L.H., MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002.
55. LISBY, G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Molecular Biotechnology**, v.12, n.2, p.75-99, 1999.

56. LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**. v.20, n.4, p.418-431, 1998.
57. LORETTI, A.P., BARROS, S.S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.134, p.193–213, 2005.
58. LOULY, C.C.B. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) (Acari: Ixodidae) no canil da polícia militar no município de Goiânia-Goiás, Brasil**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2002.
59. MACIEIRA, D.B., MESSICK, J.B., MELLO, A.F.C., FREIRE, A.M.I., LINHARES, G.F.C., ALMEIDA, N.K.O., ALMOSNY, N.R.P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, n.1, p.44-48, 2005.
60. MASSARD, C.L.; O'DWYER, L.H. Babesiose em pequenos animais e como zoonose In ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: LF Livros, 2002, p.58–67.
61. MESSICK, J.B., WALKER, P.G., RAPHAEL, W., BERENT, L., SHI, X. Candidatus *Mycoplasma haemodidelphis* sp. Nov., Candidatus *Mycoplasma haemolamae* sp. Nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. Nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.52, p.693-698, 2002.
62. MUHLNICKEL, C. J., JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. **Australian Veterinary Journal**, v.80, p. 606-610, 2002.
63. NASH, A.S., BOBADE, P.A.. Haemobartonellosis. IN **Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals**: Zeraï Woldehiwet and Miodrag Ristic. 1 ed.. 1993. p 89-111.
64. NICKEL, D.D.; OLSON, M.E.; SCHULTZ, G.A. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 3, p. 213-216, 2002.
65. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

66. O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. **Clínica Veterinária** n.31, p. 34-39. 2001.
67. OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.395-398, 2000.
68. OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 12, p. 1343-1346. 2005.
69. PALUDO, G.R., DELL'PORTO, A., TRINDADE, A.R.C., MCNUSA, C., FRIEDMAN, H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.118, p. 243-248, 2003.
70. 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**., v.127, p.81-85, 2005.
71. PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, cap.4, 1993, p.88-104.
72. READ, M.; HYDE, J.E. **Methods in molecular biology**. v.12. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1993. p.43-55.
73. RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals as man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p.119-130.
74. RUBINI, A.S., PADUAN, K.S., CAVALCANTE, G.G., RIBOLLA, P.E.R., O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Reserch**. v.97. p.91-93, 2005.
75. SANOGO, Y.O., DAVOUST, B., INOKUMA, H., CAMICAS, J.L., PAROLA, P., BROUQUI, P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**. v. 70, n.3, p. 205-212, 2003.
76. SCHETTERS, T.P.M.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v.115, p.485-493, 1997.
77. SEIBERT, M. Review of canine ehrlichiosis and occurrence of *Ehrlichia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in dogs at the Veterinary Hospital of the Federal

University of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 24, p. 113-114, 1996.

78. SHAW, S.E., DAY, M.J, BIRTLES, R.J, BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**. v.17, p.74–80, 2001.

81. SHORTT, H.E. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**. v. 3, p. 119-148, 1973.

79. SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. 1.ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. cap. 6, p. 99-110.

80. TABOADA, J., MERCHANT, S.R. **Babesiosis of companion animals and man. Tick transmitted diseases**. v.21, n.1, p.103–123, 1991.

81. TABOADA, J. Babesiosis,. In GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 2 ed. WB Saunders, Philadelphia. p. 473-481, 1998.

82. THOMPSON, K.C. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**.. v.2, p.223-229, 1976.

83. TRAPP, S.M., MESSICK, J.B., VIDOTTO, O., JOJIMA, F.S., MORAIS, H.S.A. *Babesia gibsoni* genotype Ásia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V.141, p.177-180. 2006.

84. UILEMBERG, G.; FRANSSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, v.1, p.33-40, 1989.

85. UNIVERSITY OF NEBRASKA. **Genetic Sequence Analysis Facility - Primer selection for PCR** <http://molbio.unmc.edu/courses/course-notes/chapter10.html>. Acesso em: 12 de maio, 2006.

86. WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. In: HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. p. 75-98.

87. 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**., v.84, p.544–548, 1998.

88. ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 89, p. 241-248. 2000.