

JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA

Babesiose canina em Teresina, Piauí

TERESINA/PI

2011

JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA

Babesiose canina em Teresina, Piauí

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

2011

JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA

Babesiose canina em Teresina, Piauí

Dissertação aprovada em: 28/01/2011

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva – CCA/UFPI

Orientadora

Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior – CCAA/UFMA

Examinador Externo

Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo – CCA/UFPI

Examinadora Interna

DEDICO

"Aos animais, que muitas vezes têm sua vida ceifada em prol da ciência; que a recompensa lhes seja traduzida em uma vida mais digna, vivida em um mundo sem diferenças entre homens e animais."

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua presença constante em minha vida, pelo amor, misericórdia e proteção a Seus filhos e, acima de tudo, pelas oportunidades oferecidas e pelas pessoas maravilhosas que pôs em minha vida;

À profa. Dra. Silvana Maria M. de Souza Silva, pelas oportunidades propiciadas e por ser mais que orientadora, um exemplo de profissional e amiga;

A minha família, meu porto seguro, por acreditar nos meus objetivos e me apoiar incondicionalmente;

Ao meu noivo que, com seu incentivo, amor e paciência constantes, tornam todas as coisas melhores em minha vida;

Aos meus amigos e amigas, com quem somo sorrisos e divido lágrimas, por entenderem meus momentos de ausência;

Aos amigos e colegas do Setor de Patologia Animal, por amenizar o cansaço do trabalho através de conversas e gargalhadas;

Aos médicos veterinários e funcionários do Hospital Veterinário Universitário/UFPI, por permitirem e auxiliarem a coleta das amostras;

A todos os professores que contribuíram para minha formação e, sem saber, tornaram-se exemplos para mim;

Ao prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pelo apoio e incentivo à busca de conhecimentos;

À profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho e prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes, por me proporcionarem a “iniciação científica” com dedicação e paciência;

Aos professores Dr. Prof. Lívio Martins Costa Júnior e Dra. Márcia dos Santos Rizzo, por contribuírem com seus conhecimentos a esta pesquisa;

Aos animais, para quem buscamos melhoria de vida através de nossos estudos.

A tantas outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que nosso objetivo se concretizasse.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

“Não ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros foram.”

Grahan Bell

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Fig. 1 Formas de <i>Babesia canis</i> marcadas por fluorescência (setas) indicando positividade à Reação de Imunofluorescência Indireta. Objetiva de 40x.....	33
Fig. 2 Merozoítos de <i>Babesia</i> spp. em eritrócito de esfregaço sanguíneo periférico de cão naturalmente infectado. Giemsa, objetiva de 100x.....	33
Fig. 3 Eletroforese em gel de agarose a 1,2% revelando os produtos da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do gene 18S rRNA de <i>Babesia canis vogeli</i> . Linha PM, Peso molecular 100pb. Linha C+, Controle positivo. Linhas 1-4, amostras positivas. Linhas 5-8, amostras negativas. Linha C-, controle negativo.....	34
Fig. 4 Plasmídeo recombinante pGEM-T- BCV-TWN1 de <i>Babesia canis vogeli</i> , visualizado em gel de agarose 1% após clivagem com as enzimas de restrição ApaI e NotI e produto de PCR. PM= Peso Molecular; C+ (controle positivo da reação de PCR); CC1; CC2; CC4; CC5 (fragmento de 3000 pb corresponde ao plasmídeo pGEM-T e somente o fragmento de 603 pb corresponde ao BCV-TWN1); C1, C2,C4 e C5 (produtos de PCR de 603 pb correspondente ao BCV-TWN1).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tab. 1 Frequência e fatores de risco associados à soropositividade para <i>B. canis</i> em cães de população hospitalar no nordeste do Brasil.....	36
Tab. 2 Alterações hematológicas e leucocitárias associadas à soropositividade para babesiose canina em população hospitalar no Nordeste do Brasil.....	37

SUMÁRIO

	RESUMO.....	09
	ABSTRACT.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
	1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS	13
	1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	14
	1.3 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO DA <i>Babesia</i> spp.....	15
	1.4 RESPOSTA IMUNE.....	16
	1.5 PATOGENIA E PATOLOGIA.....	17
	1.6 SINAIS CLÍNICOS.....	19
	1.7 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	21
	1.8 DIAGNÓSTICO.....	22
	1.9 TRATAMENTO.....	24
	1.10 CONTROLE E PROFILAXIA.....	25
2	CAPÍTULO 1 – Detecção molecular, sorológica e parasitológica de <i>Babesia canis vogeli</i> e achados clínicos associados à doenças em cães de população hospitalar no Nordeste do Brasil.....	28
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	46
	APÊNDICES.....	55
	ANEXOS.....	58

BRAGA, J. F. V. **Babesiose canina em Teresina, Piauí**. 2011. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

A babesiose canina é uma importante doença que acomete cães no Brasil, onde o principal agente é *Babesia canis vogeli*. No Piauí, estudos sobre a doença são escassos, embora as condições climáticas sejam favoráveis ao desenvolvimento do carrapato vetor. Esta pesquisa teve por objetivo determinar a atual situação da doença em Teresina, Piauí, e comparar métodos de diagnóstico direto e indireto, bem como identificar os fatores epidemiológicos, sinais clínicos e alterações hematológicas mais frequentes em cães infectados pelo agente. Para isto, foram avaliados 315 cães atendidos em clínicas e hospital veterinário, sob qualquer suspeita clínica e independente de sexo, raça, idade. Desses animais, foram colhidos 10 mL de sangue por venopunção jugular para avaliação hematológica, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Além disso, foram confeccionadas lâminas de esfregaços de sangue periférico para pesquisa direta do parasita. A positividade dos animais foi de 48,57% (153/315) à RIFI, 4,76% (15/315) à PCR e 2,22% (07/315) ao esfregaço sanguíneo. A concordância entre métodos de diagnóstico direto esfregaço sanguíneo e PCR foi considerada moderada ($k=0,44$). Os cães infestados por carrapatos apresentaram 1,82 vezes mais chance de possuírem anticorpos anti-*B. canis*. Cães cuja contagem de hemácias e volume globular encontravam-se dentro da normalidade apresentaram 1,88 e 1,91 vezes mais chances de serem soropositivos para *B. canis*, enquanto as alterações leucocitárias não constituíram fator de risco à soropositividade para a babesiose canina. O sequenciamento de amostras positivas à PCR resultou em um fragmento de 603 pb, cujo alinhamento e análise da sequência revelaram 99% de homologia com outros isolados de *Babesia canis vogeli*. Este estudo permite concluir que a babesiose é endêmica em cães de Teresina, nordeste do Brasil, e que a PCR pode ser empregada para diagnóstico da doença nessas áreas. Além disso, ressalta-se a necessidade de estudos que esclareçam a importância da co-infecção da babesiose canina com outras enfermidades endêmicas nesta cidade, como leishmaniose visceral canina, erliquiose e anaplasose caninas.

Palavras-chave: cães; *Babesia canis*; diagnóstico; sinais clínicos; alterações hematológicas

BRAGA, J. F. V. **Canine babesiosis in Teresina, Piauí**. 2011. 60f. Dissertation (Master of Science in Animal Science) – Post Graduate Program in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2011.

Canine babesiosis is an important disease that affects dogs in Brazil, where the primary agent is *Babesia canis vogeli*. In the state of Piauí, studies about the disease are scarce, although climatic conditions are favorable for the development of the tick vector. This study aimed to determine the current disease situation in Teresina, Piauí and compare methods of direct and indirect diagnosis, beyond to identify epidemiological factors, clinical signs and hematological changes more frequent in dogs infected by the agent. To this end, we evaluated 315 dogs attended in veterinary hospital and clinics, under any clinical suspicion and regardless of gender, breed and age. From these animals, 10 mL of blood were collected by jugular venipuncture for hematologic evaluation, Immunofluorescence Assay (IFA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). In addition, peripheral blood smears slides were prepared for direct search of parasites. The percentage of positive animals was 48.57% (153/315) in IFA, 4.76% (15/315) in PCR and 2.2% (07/315) in blood smear. The agreement between the direct diagnosis methods, blood smear and PCR, was considered moderate ($k=0.44$). Dogs infested with ticks were 1.82 times more likely to have anti-*B. canis* antibodies. Dogs with blood counts and packed cell volume were within normality were 1.88 and 1.91 times more likely to be seropositive for *B. canis*, while the leukocytic changes were not a risk factor for canine babesiosis. The sequencing of PCR positive samples resulted in a fragment of 603 bp, whose alignment and sequence analysis revealed 99% of homology with other isolates of *Babesia canis vogeli*. This study indicates that babesiosis is endemic in dogs in Teresina, northeast Brazil, and that PCR can be used to diagnostic the disease in these areas. Furthermore, we emphasize the need for studies to enlighten the co-infection importance of canine babesiosis with other diseases endemic in city, as canine visceral leishmaniasis, ehrlichiosis and anaplasmosis.

Keywords: dogs, *Babesia canis*, diagnosis, clinical signs, hematological changes

1 INTRODUÇÃO

As doenças caninas transmitidas por vetores (DCTV), que envolvem artrópodes, incluem diversas enfermidades (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009a) e afetam cães domésticos em todo o mundo (DE CAPRARIIS et al., 2010). Essas doenças representam um problema histórico e emergente em muitas partes do mundo devido à sua prevalência, relevância veterinária e potencial zoonótico (DANTAS-TORRES, 2008), sendo algumas consideradas problemas de saúde pública.

Uma vez acometidos por estas enfermidades, os animais exibem, em sua maioria, sinais clínicos inespecíficos (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). Cães doentes com histórico de exposição a vetores devem ser submetidos a exames que confirmem o agente etiológico, como citologia, sorologia ou métodos moleculares (DE CAPRARIIS et al., 2010). Entretanto, muitas são as limitações quanto à disponibilidade dessas técnicas diagnósticas, já que a maioria exige mão-de-obra e/ou equipamento laboratorial especializado (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Esta situação tem estimulado médicos veterinários a recorrer a exames hematológicos e bioquímicos para dar suporte à suspeita clínica de DCTV, apesar das alterações detectadas por estes exames serem frequentemente imprevisíveis (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009b). Este comportamento adotado pelos clínicos veterinários aumenta a possibilidade de diagnóstico equivocado da doença e condução de terapêutica inadequada, abreviando a possibilidade de cura do animal ou agravando o quadro clínico.

Entre as DCTV, a babesiose canina destaca-se por sua distribuição mundial (SÁ et al., 2006). Acomete espécies domésticas, silvestres e o homem (BOOZER; MACINTIRE, 2003; RIOS et al., 2003), sendo atualmente considerada uma zoonose (OLICHESKI, 2003). No Brasil, a doença é de grande importância veterinária (DANTAS-TORRES, 2008a) por seu caráter endêmico em todo o país e prevalência crescente em certas áreas (BASTOS, MOREIRA, PASSOS, 2004), o que está associado à alta incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* (VIDOTTO; TRAPP, 2004), cuja prevalência e intensidade de infestação vêm aumentando em cães do país (LABRUNA, 2004).

O Estado do Piauí apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento desse artrópode, com clima tropical, estações meteorológicas bem definidas, chuvas de dezembro-abril e seca de maio-novembro, temperatura variando de 19-36°C e umidade relativa do ar de 40-80% (MEDEIROS, 2004). Apesar disso, estudos sobre a babesiose canina no Estado são escassos,

embora trabalhos recentes tenham revelado alta frequência de cães de população hospitalar infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, transmitidos pelo mesmo vetor ixodídeo (SILVA, 2010). A somar, estudos prévios realizados com cães de população hospitalar em Minas Gerais revelaram soropositividade de 66,9% dos animais (RIBEIRO et al., 1990) e foi demonstrado que cães soropositivos para *Babesia canis vogeli* foram mais propensos a ser soropositivos para *Ehrlichia canis* (TRAPP et al., 2006).

Diante do exposto, buscou-se: 1) Conhecer a atual situação epidemiológica da babesiose canina em Teresina; 2) Identificar os principais fatores epidemiológicos, sinais clínicos e alterações hematológicas associados à infecção em cães naturalmente infectados; e 3) Comparar métodos diretos e indiretos no diagnóstico da doença.

1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

A babesiose canina é uma enfermidade causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmida, família Babesiidae, gênero Babesia. Atualmente, são conhecidas mais de 100 espécies de Babesia (CHAUVIN et al., 2009), das quais 18 causam doença em mamíferos domésticos (OZAKI, 1996), mas somente *B. canis* e *B. gibsoni* têm sido responsabilizadas por infectar cães causando a babesiose canina (TABOADA; MERCHANT, 1997; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006), embora haja relato de caso de infecção por *Babesia caballi* (FRITZ, 2009).

As espécies de *Babesia* spp. são classificadas em grandes ou pequenas, de acordo com o tamanho dos merozoítos. Das espécies que acometem os canídeos, *B. canis* é uma grande babesia (3-5µm) possuindo, aproximadamente, o dobro do tamanho da *B. gibsoni* (0,5-2,5µm). Os merozoítos de *B. gibsoni* são pleomórficos, sendo encontrados com maior frequência na forma oval, podendo adquirir formato de anel (TABOADA; MERCHANT, 1997), enquanto os de *B. canis* podem ser encontrados em formato arredondado, piriforme, elíptico, em cruz ou irregular, frequentemente ocorrendo em pares, mas oito ou mais podem estar presentes no mesmo eritrócito (LOBETTI, 1998; NEVES, 2000).

A *B. canis* apresenta classificação trinomial em subespécies *B. canis vogeli*, *B. canis canis* e *B. canis rossi*, cuja diferenciação é baseada na especificidade do vetor, imunidade cruzada e patogenicidade (UILENBERG, 2006). Fundamentados nesses critérios, estudos sugeriram que as subespécies de *B. canis* poderiam ser elevadas à posição de espécies (CARRET et al., 1999).

No Brasil, a doença é causada por *B. canis vogeli* e *B. gibsoni* (DANTAS-TORRES, 2008; TRAPP et al., 2006), as quais possuem patogenicidade distintas. Enquanto *B. gibsoni* é altamente patogênica (SHAW et al., 2001), *B. canis* subespécie *vogeli* é considerada de patogenicidade moderada, cursando com infecção clinicamente inaparente e responsiva à terapia antibabesial. *B. canis rossi* é a mais patogênica das subespécies e causa infecção normalmente fatal, enquanto *B. canis canis* possui patogenicidade variável, geralmente com infecção responsiva às drogas babesiais (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998).

Segundo alguns autores, as espécies de *Babesia* spp. são usualmente hospedeiro-específicas (TABOADA; MERCHANT, 1997). Entretanto, com advento do diagnóstico

molecular tem-se revelado que a especificidade de piroplasmídeos pelos hospedeiros é menor do que se supunha anteriormente (JEFFERIES et al., 2003; FRITZ, 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A distribuição geográfica do parasita e, conseqüentemente, desta enfermidade estão relacionadas diretamente à distribuição dos carrapatos vetores (SOLANO-GALLEGO et al., 2008), ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (TABOADA; MERCHANT, 1997; ANDEREG; PASSOS, 1999).

A *B. gibsoni* é encontrada com maior frequência no sudeste e extremo leste da África, Ásia, alguns casos nos EUA (TABOADA; MERCHANT, 1997) e Brasil (TRAPP et al., 2006) e raramente na Europa (TABOADA; MERCHANT, 1997). Esta espécie tem como vetores conhecidos os carrapatos *Haemaphysalis longicornis* e *H. bispinosa*. Entretanto, estes artrópodes não são encontradas no Brasil, o que levou Dantas-Torres (2008), baseado na detecção do agente no país (TRAPP et al., 2006) e respaldado em estudos de autores, a sugerir que *R. sanguineus* possa ser um vetor para *B. gibsoni*. *B. canis* é distribuída mundialmente, ocorrendo na África, Europa, EUA e Ásia, sendo frequente nos países tropicais e subtropicais (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A subespécie *B. canis vogeli* é transmitida por *R. sanguineus* e encontrada na América do Norte, América do Sul (PASSOS et al., 2005), Europa e Ásia, enquanto *B. canis canis* tem como vetor *Dermacentor reticulatus* e é mais comum na Europa (FINIZIO et al., 2010). Já *B. canis rossi* foi identificada apenas na África, aonde é transmitida pelo carrapato *H. leachi* (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998; UILENBERG, 2006).

No Brasil, o principal agente etiológico da babesiose canina é a *B. canis vogeli*, o que está associado à alta incidência do carrapato vetor *R. sanguineus* (PASSOS et al., 2005; VIDOTTO; TRAPP, 2004), o qual apresenta prevalência e intensidade de infestação crescentes em cães do país (LABRUNA, 2004). Estudos revelaram que este ixodídeo pode realizar até quatro gerações/ano no Brasil, indicando que as condições ambientais são favoráveis à ocorrência de infestação por este vetor em todas as estações do ano (LOULY, 2003).

O *R. sanguineus* é, provavelmente, a espécie de carrapato de maior distribuição mundial. É um parasito quase exclusivamente cães, mas pode ocasionalmente ser encontrado em outros hospedeiros como cavalos, bovinos ou humanos. Além do desconforto e perda sanguínea, este

artrópode pode transmitir patógenos como *B. canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* (TABOADA; MERCHANT, 1997). Acredita-se que o principal vetor da babesiose canina em áreas urbanas seja este artrópode, conhecido como carrapato marrom do cão (SHAW et al., 2001).

Este ectoparasita tem importância para saúde pública devido a sua capacidade de carrear certos patógenos e transmiti-los aos homens, pois apesar de sua antropofilia relativamente baixa (PALMAS et al., 2001), há relatos de parasitismo humano por esta espécie (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Pouco se sabe sobre os possíveis fatores de risco da babesiose canina no Brasil (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Alguns estudos demonstram que não há predisposição de raça ou sexo à infecção (RIBEIRO et al., 1990; GUIMARÃES; OLIVEIRA; SANTA-ROSA; 2002; BASTOS; MOREIRA; PASSOS, 2004; COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Entretanto, em estudo realizado com cães de população hospitalar, foi constatado que animais com mais de um ano de idade, vivendo em áreas urbanas e apresentando sangramento superficial são mais propensos a apresentar anticorpos anti-*Babesia canis vogeli* (TRAPP et al., 2006). Dantas-Torres; Figueredo (2006) observaram que, a doença acontece com maior frequência em cães com idade superior a dois anos de idade, embora animais jovens com história de visita a praia e primeira exposição a carrapatos também tenham sido afetados pela doença.

Em estudo conduzido com cães em zona rural do semiárido brasileiro não houve correlação entre prevalência da infecção e idade ou sexo dos animais, porém os animais mestiços apresentaram maior chance de adquirir a infecção quando comparados aos cães de raça pura (MAIA et al., 2007). Costa-Júnior et al. (2009), estudando cães na zona rural de Minas Gerais, observaram que a raça não constituiu um fator de risco relacionado à soroprevalência de *B. canis vogeli*, assim como sexo e volume globular abaixo de 30%. Além disso, esses autores verificaram que a soroprevalência da infecção esteve diretamente relacionada à idade dos animais e infestação por carrapatos, logo quanto mais velho o animal, maior a soroprevalência.

1.3 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO DA *Babesia* spp.

O ciclo do agente se inicia quando o carrapato infectado, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula no cão sadio os esporozoítos combinados aos componentes salivares (UILENBERG,

2006). Uma vez na circulação sanguínea, essas formas aderem-se à membrana do eritrócito e invadem essas células do hospedeiro vertebrado. Os trofozoítos intraeritrocitários multiplicam-se e formam dois ou três merozoítos e um ciclo, aparentemente, ilimitado de reprodução assexuada é estabelecido, apesar do rápido desenvolvimento de resposta imunológica. A multiplicação intracelular acelerada leva a destruição do eritrócito parasitado, com liberação de novos parasitas e subsequente infecção e destruição de outros eritrócitos (VIAL; GOREFLOT, 2006). Um pequeno percentual de merozoítos não entra em divisão e tornam-se grandes gamontes esféricos, os quais permanecem dentro dos eritrócitos (MACKENSTEDT et al., 1990).

O vetor, ao se alimentar no cão infectado, ingere várias formas do parasita presentes nas hemácias, mas somente os gamontes são capazes de evoluir no intestino do carrapato (NEVES, 2000) e tornam-se gametócitos, ocorrendo a fecundação que dará origem aos zigotos. Esses invadem as células intestinais e, na forma de esporocinetos, atingem diversos órgãos, inclusive ovário e glândulas salivares, através da hemolinfa. No ovário, podem invadir os ovos, que originam larvas infectadas, promovendo a transmissão transovariana para a próxima geração de carrapatos. Os esporocinetos que chegam às glândulas salivares multiplicam-se e formam esporozoítos que serão inoculados em cães saudáveis, caracterizando a transmissão transtadial (URQUHART et al., 1998; BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; VIDOTTO; TRAPP, 2004; NEVES, 2000; UILENBERG, 2006). A manutenção e persistência no carrapato vetor são asseguradas pelas transmissões transovariana e transtadial, às vezes persistindo por várias gerações de carrapato (CHAUVIN et al., 2009).

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A imunidade protetora aos protozoários do gênero *Babesia* spp. é mediada pelas repostas inata e adaptativa, além de produção balanceada de citocinas, uma vez que essas não estão envolvidas apenas no controle da infecção, mas podem contribuir com o progresso da doença. Enquanto a primeira envolve a participação de macrófagos e células *natural killer*, a última produz interferon- γ (INF- γ) requerido para ativação de macrófagos, que irão exibir maior expressão de receptores, atividade fagocitária e produção de mediadores de ação tóxica, como o óxido nítrico. Além disso, INF- γ está envolvido na produção de anticorpos IgG2 opsonizantes (AHMED, 2002).

Recentemente foi demonstrado que a formação de ligação de IgG e IgM à membrana do eritrócito por mecanismos imunes parece estar presente na maioria das infecções por *B. canis vogeli*, porém não naquelas causadas por *B. canis canis* (CARLI et al., 2009).

Não há imunidade cruzada entre as subespécies de *B. canis* (UILENBERG, 2006) e a resposta imune humoral se inicia sete dias após a infecção (BRANDÃO; HAGIWARA; MYIASHIRO, 2003) com os títulos de anticorpos decrescendo gradualmente até quatro a cinco meses (VERCAMMEN; DEKEN; MAES, 1997).

Na ausência do parasita, a duração da resposta imune à *B. canis* é normalmente curta (VERCAMMEN; DEKEN; MAES, 1997). Entretanto, os cães podem entrar em estado de “premunição” (WLOSNIEWSKI et al., 1997) caracterizado pela manutenção do agente no organismo na ausência de sinais clínicos, com altos títulos de anticorpos anti *B. canis* e aparente resistência a infecções subsequentes (MASUDA; BABA; ARAKAWA, 1983) por um período de até um ano, o que pode ser resultado de imunidade protetora efetiva (MARTINOD; BROSSARD; MOREAU, 1985).

1.5 PATOGENIA E PATOLOGIA

A parasitemia pode envolver de 0,2 a 45% dos eritrócitos, dependendo da espécie de *Babesia* envolvida (URQUHART et al., 1998) e a destruição do eritrócito parasitado ocorre paralelamente à multiplicação do parasita no sangue, apesar da infecção por *B. canis* ser exceção, pois o animal continua perdendo células vermelhas após o declínio da parasitemia (MAHONEY, 1977).

Diferentes mecanismos de hemólise são propostos (ONISHI et al., 1990). Acredita-se que a destruição dos eritrócitos pode ser causada pela ação mecânica de *B. canis* nas células parasitadas (MAEGRAITH; GILLES; DEVAKUL, 1957), caracterizando a hemólise intravascular vista predominantemente no início da infecção (BOUNOUS; HOSKINS; BOUDREAUX, 1993). Nas células não-parasitadas a destruição é consequência do reconhecimento pelo sistema imune, uma vez que esses eritrócitos encontram-se marcados por antígenos do parasita aderidos às suas membranas. A presença de anticorpos anti-membrana eritrocitária em cães infectados por *B. gibsoni* foi relatada (ADACHI et al., 1995), entretanto as informações relacionadas à infecção por *B. canis* são escassas. Estudos recentes revelaram

aparente ausência de anemia hemolítica imune na infecção por *B. canis canis*, diferentemente daquelas causadas por *B. gibsoni* e, provavelmente, *B. canis vogeli* (CARLI et al., 2009).

A lise das hemácias produz mediadores inflamatórios de ação sistêmica que, em processos hemolíticos graves, causam vasodilatação periférica e hipotensão (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002), logo a hipotensão é induzida e dependente do número de eritrócitos infectados por *B. canis* (SCHETTERS et al., 2009). O óxido nítrico também contribui para a vasodilatação em quadros hipotensivos na babesiose canina complicada (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Além disso, há agregação de eritrócitos (VALLI, 2007) e interação entre eritrócitos infectados e o tecido endotelial, facilitada pela hipotensão (SCHETTERS et al., 1998).

A babesiose é uma doença multissistêmica (JACOBSON, 2006), cuja forma complicada inclui manifestações que não podem ser explicadas diretamente pela hemólise, mas parecem ser resultado da resposta inflamatória do hospedeiro ao parasita, e não desde por si só (MATIJATKO et al., 2010). Isto é evidenciado pela inflamação sistêmica e hipotensão associadas à diminuição não-hemolítica do volume globular, seguida de distúrbios do sistema de coagulação e síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDMO) na fase aguda da doença, descritas por Schetters et al. (2009) e Matijatko et al. (2010). Nessa fase, os cães infectados desenvolvem severas complicações clínicas, as quais poderiam estar correlacionadas às atividades biológicas de antígenos solúveis do parasita e via da calicreína-cinina (FINIZIO et al., 2010).

A SDMO e a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) têm sido descritas na doença causada por *B. canis rossi* (WELZL et al., 2001). A hipóxia anêmica decorrente da hemólise leva ao incremento do metabolismo anaeróbico e redução da oxigenação tecidual, o que contribui para a SDMO (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002) que ocorre, principalmente, nos rins, fígado, músculos, pulmão e cérebro. Enquanto a presença de SRIS apresenta pobre valor prognóstico, a SDMO pode ser um excelente indicador de resolução da doença, uma vez que a taxa de mortalidade aumenta com o número de órgãos em falência (MATIJATKO et al., 2010).

Pode ocorrer degeneração das células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos, anóxia, acúmulo de produtos metabólicos tóxicos, fragilidade capilar e, eventualmente, perda de eritrócitos e hemorragia macroscópica (LEVINE, 1985). A grande concentração de eritrócitos parasitados no interior dos capilares do sistema nervoso central parece causar as manifestações neurológicas ocasionalmente vistas na doença (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

A morte é devido à falência do organismo e choque sistêmico, não sendo apenas devido à destruição dos eritrócitos, mas também devido à obstrução dos capilares de vários órgãos por células parasitadas e parasitas livres (LEVINE, 1985), consequência dos tampões celulares formados pela ativação do sistema de coagulação (SCHETTERS et al., 1998; HOMER et al., 2000).

À necropsia, os animais infectados por *B. canis* podem estar emaciados, anêmicos e icterícos. A injúria vascular é evidenciada por hemorragias e edema, que pode ser severo nos pulmões. O baço pode estar aumentado de tamanho e firme, com polpa vermelha hiperêmica e corpúsculos proeminentes, enquanto os rins apresentam coloração marrom escura. O fígado pode estar aumentado de volume e marrom-amarelado e, na vesícula biliar, observa-se bile espessada e abundante. Em casos severos, pode-se observar coagulação intravascular disseminada (LEVINE, 1985). Histologicamente, podem-se observar eritrócitos parasitados obstruindo capilares do córtex cerebral, além de microtrombos em vários tecidos do animal (VALLI, 2007).

1.6 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da babesiose canina têm sido bem descritos. Alguns cães são aparentemente mais resistentes à infecção, sem demonstrar sinais de parasitemia (BRANDÃO; HAGIWARA; MYIASHIRO, 2003).

A severidade das manifestações clínicas observadas na doença está relacionada ao grau de multiplicação do parasita nos eritrócitos, com subsequente lise celular (LEISEWITZ et al., 2001), e patogenicidade das diferentes espécies de *Babesia* sp. e subespécies de *B. canis* (TABOADA, 1998), o que respaldou a classificação da doença em descomplicada ou complicada (JACOBSON, 2006). Além disso, outros fatores podem influenciar na apresentação da doença, como imunidade do hospedeiro, idade e doenças concorrentes (LOBETTI, 1998), como demonstrado em estudo realizado por Solano-Gallego et al. (2008), em que a maioria dos casos de infecção por *B. canis vogeli* foram observados em animais adultos ou idosos com manifestação clínica apresentavam fatores predisponentes, como esplenomegalia ou condições imunossupressoras.

Os sinais clínicos típicos da doença descomplicada são devido à anemia hemolítica e incluem membranas mucosas pálidas, febre, taquipnéia, taquicardia, esplenomegalia, icterícia,

anorexia e depressão (TABOADA; MERCHANT, 1997; LOBETTI, 1998). A manifestação clínica da forma complicada é variável e decorrente da intensa crise hemolítica ocasionada pelo parasita e da liberação sistêmica de fatores inflamatórios (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Neste caso, há envolvimento adicional de órgãos que resulta em anemia, coagulopatia, icterícia, insuficiência renal aguda, hepatopatia, síndrome da angústia respiratória aguda, sinais nervosos, lesões miocárdicas, hemoconcentração e choque (LOBETTI, 1998; LOBETTI; DVIR; PEARSON, 2002).

A doença também pode ser descrita como hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica (LOBETTI, 1998), podendo causar desde infecção inaparente até quadro clínico grave culminando em óbito (MAIA, 2005).

A forma hiperaguda da doença é incomum e mais observada em filhotes, estando geralmente associada à intensa parasitemia e histórico de alta infestação por carrapatos (LEISEWITZ et al., 2001), com os animais acometidos manifestando resposta inflamatória sistêmica severa, choque endotóxico ou coagulação intravascular disseminada, hemoglobinúria e icterícia (HARVEY; TABOADA; LEWIS, 1988; OHNISHI et al., 1990; DASEY et al., 2001). A forma aguda é observada principalmente em infecções por *B. gibsoni* ou *B. canis rossi* (LEISEWITZ et al., 2001) e seus sinais clínicos incluem anemia, trombocitopenia, icterícia, esplenomegalia, hemoglobinúria e febre (PAGE, 1998).

Cães que se recuperam da forma aguda da infecção, podem tornar-se portadores crônicos, mantendo baixa parasitemia, sem detecção do agente ao esfregaço sanguíneo (TODOROVIC, 1975). Entretanto, quando desafiados por condições imunossupressoras ou outras infecções, esses animais podem desencadear febre intermitente, anorexia, perda de peso, anemia, edema (NELSON; COUTO, 2001; FURLANELLO et al., 2005), fraqueza, esplenomegalia e mais raramente hemoglobinúria, petéquias e icterícia (SLOSS; KEMP, 1999; NELSON; COUTO, 2001; ALMOSNY, 2002). Alguns desses animais podem desenvolver sinais de outras enfermidades crônicas, como evidências patológicas de doença hepática e/ou glomerulonefrite (TABOADA, 1998). Dependendo do estágio de infecção, podem surgir ainda distúrbios nervosos, como decúbito com movimentos de pedalagem e coma (McGAVIN; ZACHARY, 2009), associados à agregação de eritrócitos nos capilares cerebrais (VALLI, 2007). No Brasil, a forma subclínica é provavelmente a apresentação predominante nos cães com babesiose (VIDOTTO; TRAPP, 2004) e tem importância relevante na manutenção dessa enfermidade, já que esses animais apresentam-se normais ao exame físico e à pesquisa direta do parasita em

esfregaço sanguíneo, o que os torna importantes fontes de infecção para outros animais (MAIA, 2005).

Entretanto, a maioria dos sinais clínicos associados à babesiose canina são comuns a outras enfermidades, como a erliquiose canina. Uma vez que os agentes dessas enfermidades podem ser transmitidos pelo carrapato *R. sanguineus*, a co-infecção é comum, o que agrava a síndrome clínica ou mascara uma à outra enfermidade (KORDICK et al., 1999).

1.7 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Anemia e trombocitopenia são as anormalidades hematológicas primárias na babesiose canina (HAGIWARA; YAMAGA, 1987; ABDULLAHI et al., 1990). Anemia hemolítica pode ser vista em casos da doença complicada (LOBETTI, 1998), mas também em infecções por *B. canis vogeli* em cães jovens (SOLANO-GALLEGO et al., 2008).

Os cães infectados por *B. canis* podem apresentar anemia que varia de normocítica normocrômica (FURLANELLO et al., 2005) a hipocrômica (GUIMARÃES et al., 2004), sendo a primeira comumente de baixa intensidade nos primeiros dias após a infecção, podendo tornar-se macrocítica e hipocrômica à medida que a moléstia progride (TABOADA; MERCHANT, 1997). Além disso, estudos recentes revelaram que cães infectados por *B. canis canis* apresentaram anemia não-regenerativa, enquanto aqueles infectados por *B. canis vogeli* revelaram anemia regenerativa (CARLI et al., 2009). Além disso, pode-se observar policromasia, anisocitose (GUIMARÃES et al., 2004), diminuição do volume globular (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) e reticulocitose, a qual é proporcional à gravidade da anemia (GUIMARÃES et al., 2004).

A trombocitopenia na doença tem sido descrita por diversos autores, embora sua causa ainda não esteja completamente elucidada (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; GUIMARÃES et al., 2004; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Acredita-se que os mecanismos mais prováveis são a destruição mediada por anticorpos e o consumo acelerado em decorrência de uma vasculite endotelial ou do sequestro esplênico (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

As anormalidades leucocitárias são variáveis, podendo a contagem de glóbulos brancos estar aumentada ou diminuída (HAGIWARA; HOLZCHUH, 1987; DELL'PORTO; OLIVEIRA; MIGUEL, 1993). Isso se confirma pelos relatos de leucocitose com neutrofilia, monocitose,

linfopenia (GUIMARÃES et al., 2004) ou linfocitose e eosinofilia (TABOADA; MERCHANT, 1997) e leucopenia (SCHETTERS et al., 2009) com neutropenia, monocitopenia e linfopenia (FURLANELLO et al., 2005).

Os testes bioquímicos são inespecíficos, podendo ser observadas azotemia e acidose metabólica geralmente causadas pela desidratação e/ou choque (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Hipoalbuminemia foi observada em 31% dos casos de babesiose canina avaliados por Furlanello et al. (2005). A hiperbilirrubinemia é um achado consistente durante a fase aguda da infecção por *Babesia canis*, mas não por *B. gibsoni* (HOSKINS; BOUDREAU; BOUNOUS, 1993). As enzimas hepáticas podem estar aumentadas durante a doença complicada em consequência da hipóxia anêmica do órgão (TABOADA; MERCHANT, 1997). Na urinálise, podemos observar bilirrubinúria (FURLANELLO et al., 2005) e hemoglobínúria, acompanhada ou não de proteinúria, cilindrúria granular e presença de células do epitélio renal, indicativa de lesão renal aguda decorrente da hemoglobínúria ou hipoperfusão do órgão (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

1.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da babesiose canina baseia-se na anamnese e em sinais clínicos (ABDULLAHI; MOHAMMED; TRIMNELL, 1990), porém não é seguro, uma vez que existem várias doenças com sinais clínicos semelhantes a ela. Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial direto ou indireto destaca-se por fornecer maior confiabilidade ao clínico veterinário (BÖSE et al., 1995).

Durante a fase aguda da doença, o esfregaço sanguíneo realizado a partir de uma gota de sangue periférico pode ser utilizado como método de diagnóstico (BÖSE et al., 1995; PASSOS et al., 2005), o qual baseia-se no tamanho e aparência morfológica das formas intraeritrocitárias visualizadas (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). O corante de eleição para este tipo de diagnóstico da enfermidade é o Giemsa (OLICHESKI, 2003), pelo qual o citoplasma do protozoário se cora em azul-claro e o núcleo em vermelho-violeta (ANTONIO; OLIVEIRA; ZAPPA, 2009). Embora seja caracterizado por rapidez, baixo custo e alta especificidade, este método apresenta baixa sensibilidade quando a parasitemia encontra-se reduzida (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006), pois em infecções crônicas, subclínicas, animais tratados ou em fase inicial da doença a

presença de *Babesia* spp. é escassa e a ausência de parasitas no esfregaço sanguíneo não exclui a possibilidade de infecção (WLOSNIIEWSKI et al., 1997; BOOZER; MACINTIRE, 2003; MAIA, 2005; PASSOS et al., 2005).

Diante dessas limitações, os métodos sorológicos têm sido usados para diagnóstico de infecções com baixos níveis de parasitemia, crônicas ou subclínicas (BOOZER; MACINTIRE, 2003; VERDIDA et al., 2004). Entre as técnicas sorológicas, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido a mais amplamente utilizada por sua alta sensibilidade, baixo custo e fácil operacionalidade, tendo sido bastante empregada em pesquisas epidemiológicas (BÖSE et al., 1995; ABOGE et al., 2007). Entretanto, sua especificidade é limitada uma vez que podem ocorrer falso-positivos por exposição prévia ao parasita, permanência de anticorpos colostrais em filhotes até cinco meses após o nascimento, não reversão do *status* sorológico do animal para negativo após autoesterelização ou quimioesterelização (MAIA, 2005), após a qual o cão pode permanecer soropositivo por longos períodos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) e a ocorrência de reações cruzadas (BOBADE; ODUYE; AGHOMO, 1989; MAIA, 2005). Também podem ocorrer resultados falso-negativos em infecções recentes, uma vez que são necessários de cinco a 10 dias após a infecção para detecção de anticorpos anti-*Babesia* (TABOADA; MERCHANT, 1997).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) alia especificidade e sensibilidade (BÖSE et al., 1995), proporcionando a detecção do agente em infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia (MACINTIRE et al., 2002) e ainda pode ser utilizada para validar resultados de outras técnicas de diagnóstico (BÖSE et al., 1995). Esta técnica pode ser aplicada, ainda, no monitoramento de terapia e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica deste patógeno (PERSING et al., 1992). Devido às suas vantagens, tem-se sugerido o emprego deste método de diagnóstico na rotina clínica de pequenos animais, o que forneceria maior confiabilidade aos resultados (MOTTIN et al., 2008). No Brasil, entretanto, seu uso ainda restringe-se à pesquisa (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Outras técnicas de biologia molecular que vêm sendo utilizadas para diagnóstico e estudo da babesiose canina são a Nested PCR, semi-nested PCR, o polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP-PCR) e PCR em tempo real (MATSUU et al., 2005).

1.9 TRATAMENTO

O Dipropionato de Imidocarb é uma das drogas disponíveis para tratamento da babesiose em cães (VIAL; GORENFLOT, 2006) e apresenta efeito direto sobre o agente, alterando a forma do núcleo e a morfologia citoplasmática e interrompendo a parasitemia e os sintomas clínicos 24 a 48 horas após sua aplicação (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A quimioterapia efetiva pode ser alcançada por duas doses de 5,0-6,6 mg/kg injetadas por via subcutânea ou intramuscular, com intervalo de duas a três semanas (TABOADA, 1998). Esta droga possui efeitos colinérgicos indesejados, os quais podem ser prevenidos pela utilização de atropina (0,04 mg/kg) 10 minutos antes de sua aplicação (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

Outra possibilidade de tratamento é com o aceturato de diminazeno (TABOADA, 1998), cuja ação interfere na glicólise aeróbica e a síntese de DNA do parasita. Para tratamento de *B. canis* a dose única de 3,5mg/kg, via intramuscular ou subcutânea, é efetiva, enquanto para *B. gibsoni* o procedimento deve ser repetido após 24 horas (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

Há relatos clínicos de tratamento bem sucedido com clindamicina na dose de 25 mg/kg, duas vezes ao dia, e azitromicina na dose de 5 a 10 mg/kg, via oral, duas vezes ao dia, porém faltam estudos controlados sobre a eficácia destes medicamentos. O uso de 0,25 mg/kg de sulfato de quinurônio, aplicado via subcutânea, a cada 48 horas, demonstrou boa efetividade no tratamento para a *B. canis*, entretanto sua ação é desconhecida para a *B. gibsoni* (TABOADA, 1998). Os quimioterápicos utilizados para tratamento da babesiose causada por *B. gibsoni* parecem incapazes de eliminar completamente a doença na dose recomendada, apenas limitando a mortalidade e a severidade dos sinais clínicos (TABOADA; MERCHANT, 1997; BIRKENHEUER et al., 1999). Além disso, terapias de suporte como fluidoterapia e transfusão sanguínea devem ser empregadas para tratamento da doença, quando necessárias.

É importante considerar os benefícios do tratamento visto que, em infecção experimental, cães tratados com dipropionato de imidocarb eliminaram a infecção, mas tornaram-se mais susceptíveis à reinfecção devido à inibição da manutenção de anticorpos protetores (BRANDÃO; HAGIWARA; MYIASHIRO, 2003). Além disso, os proprietários devem estar cientes de que cães que sobrevivem à babesiose podem permanecer infectados subclínicamente e podem sofrer recidivas da doença no futuro ou servir como fonte de infecção para a propagação da doença em determinada área (VIAL; GORENFLOT, 2006).

1.10 CONTROLE E PROFILAXIA

A prevenção da babesiose canina não é uma tarefa fácil, como todas as doenças transmitidas por carrapatos. Uma vacina foi desenvolvida e encontram-se disponíveis comercialmente na Europa e, embora não previna a infecção, é capaz de limitar o desenvolvimento da parasitemia, a redução do hematócrito e esplenomegalia após desafio com cepa homóloga (SCHETTERS et al., 1997). Entretanto, o uso de vacina é limitado pelas diferenças antigênicas entre os isolados (VERCAMMEN; DEKEN; MAES, 1996). No Brasil, não há vacinas contra a doença, logo as tentativas para evitar sua ocorrência têm se concentrado no combate à infestação por carrapatos (MARTINOD; BROSSARD; MOREAU, 1985; BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; VIDOTTO; TRAPP, 2004). É importante ressaltar que de Caprariis et al. (2010) observaram que a prevalência da babesiose por *B. canis vogeli* em cães que receberam tratamento acaricida foi 17,6%, enquanto nos animais não tratados a prevalência foi de 5,9%.

O clima do Brasil é favorável ao carrapato *R. sanguineus*, possibilitando o desenvolvimento de até quatro gerações por ano, logo os proprietários devem ser instruídos para manter seus cães livres desses artrópodes através da inspeção frequente da pele e pêlos do animal e remoção dos carrapatos, além da realização de tratamento acaricida (MARTINOD; BROSSARD; MOREAU, 1985; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) realizado nos cães e no ambiente (LABRUNA; PEREIRA, 2001). O uso indiscriminado de carrapaticida pode gerar efeitos indesejáveis, como poluição ambiental e desenvolvimento de resistência por esses artrópodes (VIDOTTO; TRAPP, 2004). Pode-se associar a injeção intramuscular de imidocarb para prevenção da doença por *B. canis*, na dose de 4–6 mg/kg, por duas a seis semanas (BOURDOISEAU, 2006).

Outra medida para prevenção da doença inclui a realização de testes sorológicos em animais recém-adquiridos para evitar a introdução de animais portadores assintomáticos em canis livres da doença. Além disso, como o agente pode ser transmitido por transfusão sanguínea, recomenda-se que cães doadores sejam submetidos a exames para certificar que estejam livres da infecção (FREEMAN et al., 1994).

Baseados na importância do estudo de enfermidades caninas, nos propomos a estudar a babesiose nesta espécie. O objetivo deste estudo foi determinar a situação da babesiose canina em Teresina, Piauí e descrever os aspectos epidemiológicos, sinais clínicos e alterações hematológicas associados à infecção. Além disso, comparar métodos diretos e indiretos no diagnóstico da doença. Os resultados produzidos encontram-se descritos no capítulo I desta dissertação, o qual representa o artigo científico intitulado “**Detecção molecular, sorológica e parasitológica de *Babesia canis vogeli* e achados clínicos associados à doença em cães de população hospitalar no Nordeste do Brasil**” a ser encaminhado para publicação na revista *Parasitology Research* estruturados de acordo com as normas da mesma.

2 CAPÍTULO 1

Deteção sorológica, parasitológica e molecular de *Babesia canis vogeli* e achados clínicos associados à doença em cães de população hospitalar no Nordeste do Brasil

Juliana F V Braga; Francisco A L Souza; Lucilene S Silva; Luciano S Fonseca; Flaviane A Pinho;
Wesley L Fotoran; Eduardo M R Sanchez; Múcio F B Ribeiro; Lívio M Costa Júnior; Francisco A L Costa;
Silvana M M S Silva

Juliana F V Braga (*) · Francisco A L Souza · Lucilene S Silva · Luciano S Fonseca ·
Francisco A L Costa · Silvana M M S Silva
Setor de Patologia Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí
Campus Agrícola da Socopo - Ininga, Teresina, Piauí, Brasil
Telephone: +55-86-3215-5760 Fax: +55-86-3215-5740
e-mail: jufortes22@gmail.com

Flaviane A Pinho
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 - São Paulo, São Paulo, Brasil

Múcio F B Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Lívio M Costa Júnior
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, universidade Federal do Maranhão
BR 222, Km 04, Boa Vista – Chapadinha, Maranhão, Brasil

Resumo: Estudos sobre a babesiose canina são escassos no nordeste do Brasil, apesar das condições climáticas favoráveis ao carrapato vetor. Esta pesquisa objetivou determinar a situação da doença em Teresina, nordeste do Brasil, além de comparar métodos diretos e indiretos de diagnóstico e identificar os fatores epidemiológicos, sinais clínicos e alterações hematológicas mais frequentes em cães infectados por *B. canis vogeli*. Para isto, foram avaliados 315 cães atendidos em clínicas veterinárias, sob qualquer suspeita clínica, dos quais foi colhido sangue por venopunção jugular para avaliação hematológica, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Além disso, esfregaços de sangue periférico foram realizados para pesquisa direta do parasita. A positividade dos animais foi de 48,57% (153/315) à RIFI, 4,76% (15/315) à PCR e 2,22% (07/315) ao esfregaço sanguíneo. A concordância entre métodos de diagnóstico direto esfregaço sanguíneo e PCR foi considerada moderada ($k=0,44$). Os cães infestados por carrapatos apresentaram 1,82 vezes mais chance de possuírem anticorpos anti-*B. canis*. Cães cuja contagem de hemácias e volume globular encontravam-se dentro da normalidade apresentaram 1,88 e 1,91 vezes mais chances de serem soropositivos para *B. canis*. As alterações

leucocitárias, entretanto, não constituíram fator de risco à soropositividade para a babesiose canina. O sequenciamento de amostras positivas à PCR resultou em um fragmento de 603 pb, cujo alinhamento e análise da sequência revelaram 99% de homologia com outros isolados de *Babesia canis vogeli*. Este estudo permite concluir que a babesiose canina é endêmica em cães de Teresina, nordeste do Brasil, e que a PCR pode ser um método de escolha para diagnóstico da doença nessas áreas.

Keywords: *Canis familiaris*; babesiose canina; diagnóstico, sinais clínicos; alterações hematológicas.

Introdução

A Babesiose canina é uma enfermidade emergente em todo o mundo (Jefferies et al. 2007) causada por protozoários parasitas intraeritrocitários do gênero *Babesia* e transmitida por carrapatos ixodídeos de diferentes gêneros e espécies. A *B. gibsoni* e *B. canis* são responsáveis por infectar cães (Dantas-Torres e Figueredo 2006), sendo a última classificada nas subespécies *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli*, cuja diferenciação é baseada na distribuição geográfica, especificidade do vetor, patogenicidade (Uilenberg et al. 1989) e características genéticas (Zahler et al. 1998).

Os sinais clínicos da babesiose canina incluem anemia, hemoglobinúria, linfadenomegalia, esplenomegalia, letargia, anorexia (Bourdoiseau 2006; Carli et al. 2009) e icterícia (Furlanello et al. 2005). Entretanto, podem variar dependendo da espécie ou isolado envolvido, imunidade do hospedeiro, idade, doenças concomitantes e localização geográfica (Uilenberg 2006; Gopegui et al. 2007). No Brasil, a apresentação predominante da babesiose canina é uma doença relativamente branda (Cacciò et al. 2002), relatada em praticamente todas as regiões do Brasil e causada por *Babesia canis vogeli* (Dantas-Torres 2008a), cujo único vetor conhecido é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres 2008b). Entretanto, há relatos de infecção pela espécie *B. gibsoni* em cães no sul do país (Trapp et al. 2006a), a qual apresenta alta patogenicidade (Shaw et al. 2001) e tem como vetores conhecidos os carrapatos *Haemaphysalis longicornis* e *H. bispinosa*. No entanto, esses artrópodes não são encontrados no Brasil, o que levou Dantas-Torres (2008a) a considerar a possibilidade de *R. sanguineus* ser transmissor da espécie.

Entre as alterações hematológicas mais observadas, destaca-se anemia hemolítica normocítica normocrômica discreta na fase inicial que evolui para macrocítica hipocrômica com o progresso da enfermidade (Furlanello et al. 2005; Carli et al. 2009). Trombocitopenia moderada a severa pode ser observada com frequência, independente da subespécie envolvida (Carli et al. 2009).

A resposta imune celular é a mais importante no combate às infecções por *Babesia* spp. (Vidotto e Trapp 2004), entretanto não há imunidade cruzada entre as subespécies de *B. canis* (Uilenberg 2006). Anticorpos podem ser detectados cinco a doze dias pós-infecção, alcançando um valor máximo em torno do 21º dia (Bourdeau et al. 1995) e a imunidade subespécie-específica dura aproximadamente cinco meses, estando o hospedeiro susceptível à reinfeção após este período (Vercammen et al. 1997).

O diagnóstico pode ser realizado com base no tamanho e morfologia de formas intraeritrocitárias em esfregaços de sangue periférico (Passos et al. 2005), as quais podem ser mais facilmente visualizadas durante a parasitemia, especialmente em cães febris (Guimarães et al. 2004). Os testes sorológicos são úteis na identificação

de infecções subclínicas e crônicas, nas quais a parasitemia pode ser baixa e não detectável em esfregaços de sangue periférico. Entretanto, mesmo após a eliminação do agente, os cães podem permanecer soropositivos (Dantas-Torres e Figueredo 2006), o que torna a demonstração do DNA de *B. canis* um método mais seguro por possibilitar a detecção do agente e a diferenciação de espécies (Martin et al. 2006).

A cidade de Teresina, localizada no Nordeste do Brasil, apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento desse artrópode, com clima tropical, temperatura variando de 19-36°C e umidade relativa do ar de 40-80% (Medeiros 2004). Apesar disso, estudos sobre a babesiose canina nesta cidade são escassos, embora trabalhos recentes tenham revelado alta frequência de cães de população hospitalar infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, transmitidos pelo mesmo vetor ixodídeo (Silva 2010).

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo determinar a situação da babesiose canina causada por *B. canis vogeli* na cidade de Teresina, nordeste do Brasil, além de descrever os fatores epidemiológicos, sinais clínicos e alterações hematológicas mais frequentes na infecção e comparar métodos diretos e indiretos no diagnóstico da doença.

Material e Métodos

Animais

Trezentos e quinze cães foram avaliados durante atendimento clínico no Hospital Veterinário (CCA/UFPI) e clínicas veterinárias particulares da cidade de Teresina (Piauí, Brasil) independente de suspeita clínica, idade, gênero ou padrão racial, no período de abril de 2008 a junho de 2010. A amostra foi definida considerando-se uma prevalência de 55% observada à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em estudo prévio (Carvalho et al. 2001), com intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 10% (Centro Panamericano de Zoonoses 1973). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimental com Animais da Universidade Federal do Piauí sob o nº 048/2010.

Coleta de dados e amostras

Informações sobre idade, gênero e padrão racial foram registradas em ficha individual e o exame clínico foi conduzido por médicos veterinários, buscando identificar a presença de ectoparasitas, avaliar mucosas visíveis e temperatura corpórea do animal e quaisquer outras alterações. Para análise sorológica foram colhidas amostras sanguíneas em tubos a vácuo sem anticoagulante, por venopunção jugular. Após centrifugação, os soros obtidos foram conservados a -20°C até a realização da RIFI. Foram ainda colhidas amostras sanguíneas em tubo a vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) destinadas à análise hematológica e extração de DNA.

Pesquisa de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos

Esfregaços de sangue capilar obtido por punção do pavilhão auricular foram confeccionados, fixados em álcool metílico e corados por Giemsa para pesquisa do parasito sob imersão em objetiva de 100X.

Análise hematológica

A determinação da contagem global de hemácias (Hg), concentração de hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), concentração hemoglobínica globular média (CHGM) e número de plaquetas foi realizada por técnica automatizada (Vet ABC). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por observação de esfregaço sanguíneo corado por May-Grunwald-Giemsa, visualizado sob microscopia de luz em objetiva de 100X. Os valores de referência utilizados para análise do hemograma foram descritos por Meinkoth e Clinkenbeard (2000). A anemia foi considerada quando o hematócrito encontrava-se abaixo de 37%.

Detecção de anticorpos anti-*Babesia canis vogeli*

A pesquisa de anticorpos anti-*Babesia canis* foi realizada através de RIFI, como descrito por IICA (1987). As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX41 Laboratory Microscope) em objetiva de 40X, sendo consideradas positivas as reações com fluorescência em torno dos parasitos e animais cujo soro apresentou título maior ou igual a 1:40.

Detecção do DNA de *Babesia canis vogeli*

Os DNA das amostras sanguíneas foram extraídos por meio do kit Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) e quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop 2000/2000c, Thermo Scientific). Para a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram utilizados iniciadores de amplificação específicos para a subespécie *Babesia canis vogeli*, com o *primer forward* BAB1 (5'-GTG AAC CTT ATC ACT TAA AGG-3') e o *reverse* BAB4 (5'-CAA CTC CTC CAC GCA ATC G-3'), sendo *primer forward* selecionado de uma região conservada da extremidade 3' do gene 18S rRNA de gênero *Babesia* e o *reverse* de genes rRNA da grande subunidade de *Babesia canis vogeli* (Duarte et al. 2008).

A mistura foi constituída por 1x Taq buffer; 0,2 mM de cada dNTP (Promega); 1,0mM MgCl₂; 0,4µM de cada primer; 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega) e água ultrapura suficiente para 25µl de reação. O volume de amostra variou em 3µl (> 80ng/µl), 5µl (31 ≥ 80 ng/µl) ou 10µl (≤ 30ng/µl), visando obter de 200 a 500ng de DNA na amostra para a reação. A amplificação do DNA do agente foi realizada em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf). A desnaturação inicial foi realizada a 94 °C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por um minuto e extensão final a 72 °C por cinco minutos. Os produtos obtidos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo e registrados em fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems). Foram considerados positivos aqueles produtos com aproximadamente 603 bp.

Sequenciamento genético

Os produtos amplificados em gel de agarose foram aleatoriamente selecionados, purificados utilizando-se o QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen) e clonados no vetor pGEM-T (Promega). A extração plasmidial foi realizada por meio do kit QIAprep®Spin Miniprep kit (Qiagen) e analisada em gel de agarose 1,0% em TAE 1X, após coloração em solução de brometo de etídio. As reações foram realizadas utilizando o kit APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing e sequenciador automático ABI 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do software Chromas Lite version 2.01[®] e, em seguida, comparadas às sequências depositadas no GenBank, com auxílio do programa Blast.

Análise estatística

Os dados de frequência de babesiose canina foram dispostos em tabelas de distribuição de frequência simples. Para avaliar a concordância entre os métodos de diagnóstico direto foi utilizado o teste Kappa, com resultados interpretados segundo Landis e Koch (1977). O teste do Qui-quadrado (χ^2) foi empregado para análise da associação entre animais positivos à RIFI e as variáveis idade, gênero, padrão racial, infestação por carrapatos, sinais clínicos e alterações hematológicas; probabilidade menor que 0,05 ($P < 0,05$) foi considerada estatisticamente significativa. *Odds Ratio* (OR) e valor de P foram calculados separadamente para cada variável e a regressão logística foi realizada com probabilidade menor que 0,20 ($P < 0,20$) das variáveis em análise univariada usando o software Minitab 14 for Windows.

Resultados

Reação de Imunofluorescência Indireta

A detecção de anticorpos anti-*Babesia canis* (Fig. 1) ocorreu em 48,6% (153/315) dos cães analisados. Entretanto, em apenas 2,6% (4/153) dos animais que possuíam anticorpos foram visualizadas formas de *Babesia* spp. ao esfregaço sanguíneo e em 6,5% (10/153) houve amplificação do DNA do agente.

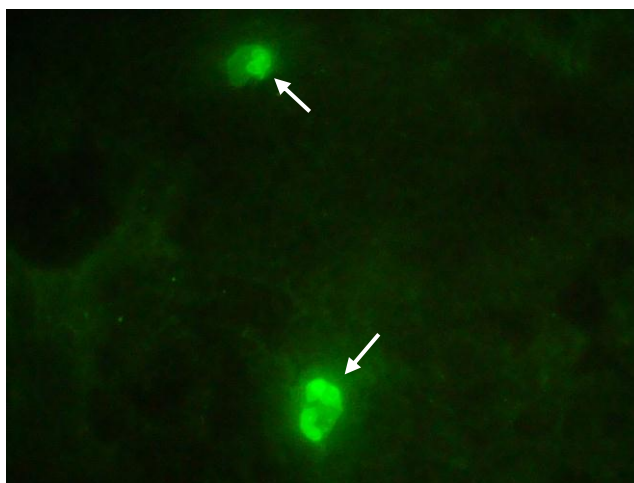


Fig. 1 Formas de *Babesia canis* marcadas por fluorescência (setas) indicando positividade à Reação de Imunofluorescência Indireta. Objetiva de 40x

Esfregaços sanguíneos

Trofozoítos e/ou merozoítos de *Babesia* spp. (Fig. 2) foram visualizados em 2,2% (7/315) dos animais estudados, dos quais 71,4% (5/7) tiveram DNA do agente amplificado à PCR. Além disso, 57,1% (4/7) dos animais com inclusões intraeritrocitárias compatíveis com o agente apresentavam anticorpos anti-*Babesia canis vogeli* e tiveram o DNA do agente detectado à PCR. Foram observadas ainda formas amastigotas de *Leishmania* spp. em 10,8% (34/315) dos cães, inclusões intracelulares de *Ehrlichia* spp. em 1,6% (5/315) dos esfregaços sanguíneos, *Anaplasma platys* em 1,3% (4/315) e Corpúsculo de Lentz em 0,3% (1/315).

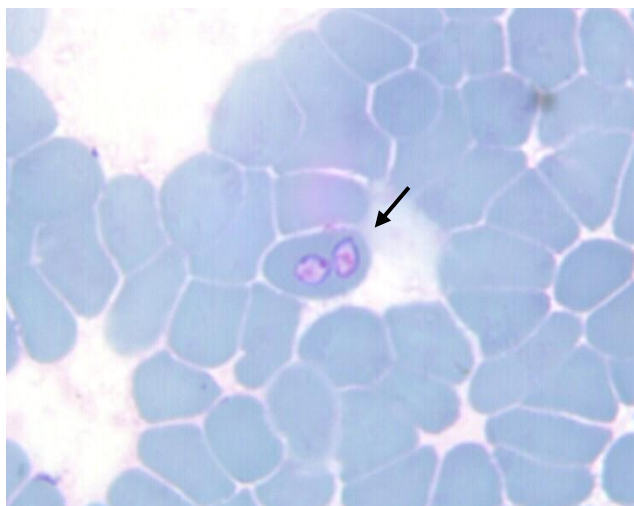


Fig. 2 Merozoítos de *Babesia* spp. em eritrócito de esfregaço sanguíneo periférico de cão naturalmente infectado. Giemsa, objetiva de 100x

Reação em Cadeia pela Polimerase

Em 4,8% (15/315) das amostras sanguíneas foi detectado DNA de *B. canis vogeli* (Fig. 3). Dos animais avaliados, o agente foi identificado à PCR e ao esfregaço sanguíneo em 1,6% (5/315), demonstrando que em apenas 33,3% (5/15) dos casos positivos à PCR foi possível a identificação do agente por pesquisa direta do parasita. A concordância entre a técnica do esfregaço sanguíneo e a PCR foi considerada moderada ($k=0,44$).

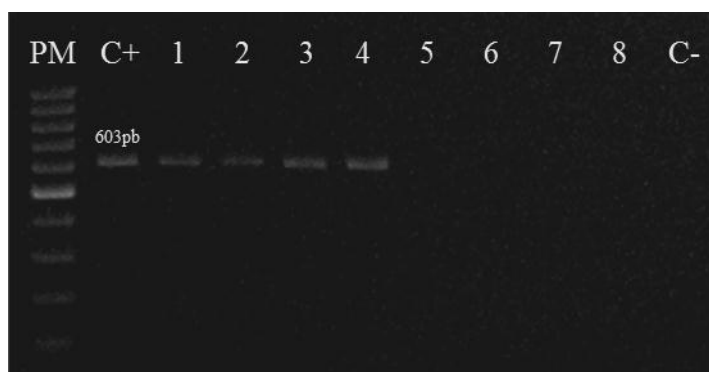


Fig.3 Eletroforese em gel de agarose a 1,2% revelando os produtos da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do gene 18S rRNA de *Babesia canis vogeli*. Linha PM, Peso molecular 100pb. Linha C+, Controle positivo. Linhas 1-4, amostras positivas. Linhas 5-8, amostras negativas. Linha C-, controle negativo

Sequenciamento dos produtos amplificados

O sequenciamento resultou em um fragmento de 603 pb (Fig. 4) com 99% de homologia com os isolados de *Babesia canis vogeli* em Recife, Brasil (FJ588003.1), Twain (EF180055.1) e Cabo Verde (GC395377.1).

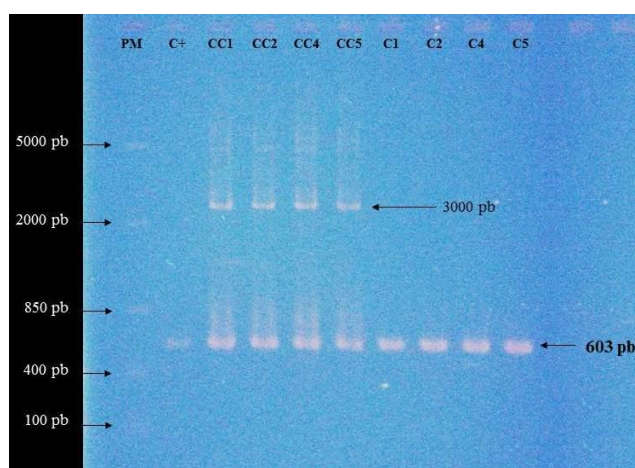


Fig. 4 Plasmídeo recombinante pGEM-T- BCV-TWN1 de *Babesia canis vogeli*, visualizado em gel de agarose 1% após clivagem com as enzimas de restrição *Apa*I e *Not*I e produto de PCR. PM= Peso Molecular; C+ (controle positivo da reação de PCR); CC1; CC2; CC4; CC5 (fragmento de 3000 pb corresponde ao plasmídeo pGEM-T e somente o fragmento de 603 pb corresponde ao BCV-TWN1); C1, C2, C4 e C5 (produtos de PCR de 603 pb correspondente ao BCV-TWN1)

Perfil epidemiológico

A maior parte dos animais que possuíam anticorpos anti-*B. canis* encontraram-se na faixa etária de três a oito anos e representaram 37,6% (56/149) dos cães, seguida de animais com idade entre um e três anos, 30,9% (46/149), animais com idade inferior a um ano, 24,8% (37/149) e com mais de oito anos, 6,7% (10/149). A frequência de animais machos soropositivos foi 59,5% (91/153), superior às fêmeas que representaram 40,5% (62/153) dos casos. Os cães sem raça definida (SRD) representaram 54,9% (84/153) dos animais soropositivos, enquanto aqueles de raça pura foram 45,1% (69/153) dos casos. As variáveis idade, gênero e padrão racial não representam fatores de risco à soroprevância de *B. canis* (Tab. 1).

Tab. 1 Frequência e fatores de risco associados à soropositividade para *B. canis* em cães de população hospitalar no nordeste do Brasil

Fator de risco	Sorologia			
	% Prevalência (+/n)	Odds ratio	Valor de P	IC 95%
<i>Idade</i>				
< 1 ano	43,8 (35/80)	Ref.	Ref.	Ref.
1-3 anos	50,0 (45/90)	1,280	0,50	0.70-2.35
> 3 anos	50,8 (62/122)	1,32	0,40	0.75-2.34
<i>Gênero</i>				
Macho	49,70 (82/165)	1,100	0,760	0.69-1.75
Fêmea	47,24 (60/127)	Ref.	Ref.	Ref.
<i>Raça</i>				
Raça Pura	43,14 (66/153)	Ref.	Ref.	Ref.
SRD	54,68 (76/139)	1,590	0,060	1.00-2.52

+: número de animais positivos; n: número de amostras por variável; Valor de P: probabilidade; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Ref.: variável utilizada como valor de referência.

Sinais clínicos e Alterações hematológicas

A frequência de animais soropositivos que apresentaram, no mínimo, um dos 13 sinais clínicos registrados foi 92,7% (140/151), sendo os mais frequentes linfadenopatia (63,6%), presença de carrapatos (61,0%), alterações dermatológicas (42,4%), anorexia/hiporexia (31,1%), apatia (28,5%), emagrecimento (24,5%), febre (21,2%), desidratação (4,0%), edema (4,0%), hemorragias petequiais (2,0%), alterações nervosas (1,3%), icterícia (0,7%) e hemoglobinúria (0,7%). A análise estatística revelou que apenas presença de carrapatos constituiu-se em fator de risco para infecção por *B. canis*, em que os cães infestados apresentaram 1,82 vezes mais chance de possuírem anticorpos anti-*B. canis*.

A maioria dos animais que possuíam anticorpos anti-*B. canis* exibiram contagem de hemácias e volume globular abaixo do valor de referência, 51,4% (75/146) e 62,3% (91/146), respectivamente. Entretanto, a análise estatística revelou que aqueles cães com estes parâmetros hematológicos dentro da normalidade apresentaram 1,88 e 1,91 vezes mais chances de serem soropositivos para *B. canis*. A trombocitopenia, embora observada em 41,1% (60/146) dos cães sororeagentes, não alterou o risco de infecção para babesiose canina. Dentre as alterações leucocitárias, linfopenia e eosinopenia estiveram presentes em 6,2% (9/146) e 11,6% (17/146) dos animais soropositivos, porém não foram estatisticamente significativas (Tab. 2).

Tab. 2 Alterações hematológicas e leucocitárias associadas à soropositividade para babesiose canina em população hospitalar no Nordeste do Brasil

Fator de risco	Sorologia			
	% Prevalência (+/n)	Odds ratio	Valor de P	IC 95%
<i>Hemácias</i>				
< 5.5	42,1 (72/171)	Ref.	Ref.	Ref.
5.5 - 8.5	57,8 (70/121)	1,88	0,01	1.17-3.02
<i>VG</i>				
< 37	44,4 (91/205)	Ref.	Ref.	Ref.
> 37	60,4 (55/91)	1,91	0,01	1.15-3.16
<i>Bastonetes</i>				
0-300	49,5 (144/291)	1,46	0,97	0.24-8.92
>300	40,0 (2/5)	Ref.	Ref.	Ref.
<i>Hb</i>				
<12	45,0 (76/169)	0,690	0,150	0.43-1.10
12 -- 18	54,1 (66/122)	Ref.	Ref.	Ref.
> 18	0,0 (0/1)			
<i>VGM</i>				
<60	50,6 (45/89)	1,14	0,69	0.69-1.88
60-77	47,3 (95/201)	Ref.	Ref.	Ref.
> 77	100,0 (2/2)			
<i>CHGM</i>				
<32	45,4 (10/22)	0,69	0,56	0.27-1.71
32-36	54,7 (70/128)	Ref.	Ref.	Ref.
>36	43,7 (62/142)	0,64	0,09	0.39-1.03
<i>Plaquetas</i>				
<200	46,3 (57/123)	0,84	0,55	0.52-1.35
200-500	50,6 (79/156)	Ref.	Ref.	Ref.
>500	46,2 (6/13)	0,83	0,98	0.26-2.59
<i>Leucócitos</i>				
< 6000	46,2 (18/39)	0,900	0,910	0.45-1.80
6000 - 17000	48,7 (91/187)	Ref.	Ref.	Ref.
> 17000	50,0 (33/66)	1,05	0,96	0.60-1.84
<i>Neutrófilos</i>				
< 3000	46,4 (13/28)	0,860	0,870	0.39-1.91
3000 - 11500	50,0 (101/202)	Ref.	Ref.	Ref.
> 11500	45,2 (28/62)	0,82	0,6	0.46-1.45
<i>Linfócitos</i>				
< 1	26,7 (8/30)	0,360	0,020	0.15-0.85
1 - 4,8	50,0 (110/220)	Ref.	Ref.	Ref.
> 4,8	57,1 (24/42)	1,33	0,49	0.68-2.59
<i>Eosinófilos</i>				
< 100	33,3 (16/48)	0,470	0,030	0.24-0.92
100 - 1250	51,1 (112/219)	Ref.	Ref.	Ref.
> 1250	56,0 (14/25)	1,21	0,8	0.52-2.79
<i>Monócitos</i>				

< 150	36,8 (14/38)	0,580	0,180	0.29-1.18
150 - 1350	49,8 (124/249)	Ref.	Ref.	Ref.
> 1350	80,0 (4/5)	4,03	0,37	0.44-36.58

+: número de animais positivos; n: número de amostras por variável; Valor de P: probabilidade; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Ref.: variável utilizada como valor de referência.

Discussão

Em um pequeno percentual de cães foi possível a detecção do agente pela técnica do esfregaço sanguíneo, por outro lado a maioria dos casos em que o DNA do agente foi amplificado não houve visualização de *Babesia* spp. à pesquisa direta. De maneira semelhante, porém estudando cães da zona rural, O'Dwyer et al. (2009) observaram que a prevalência de animais infectados por *B. canis* ao esfregaço sanguíneo foi inferior à PCR. Miranda et al. (2008) também encontraram baixa prevalência da doença ao esfregaço sanguíneo em cães domiciliados de Campos dos Goytacazes. A positividade ao esfregaço sanguíneo inferior à análise molecular deve-se ao fato de que, embora o parasitismo do sangue capilar seja normalmente superior ao do sangue venoso (Bicalho et al. 2002), a baixa parasitemia expressa pelo animal após a fase aguda da doença (Todorovic 1975) tornam as hemácias parasitadas um achado inconstante na circulação sanguínea (Bicalho et al. 2002), o que não exclui a possibilidade de infecção (Passos et al. 2005). Além disso, quando aparecem os sinais clínicos, o pico de parasitemia ocorreu há aproximadamente sete dias (Assis 1993), comprometendo o diagnóstico por esfregaço. Deve-se considerar que as amostras deste estudo foram provenientes de cães de população hospitalar, com grande chance do pico de parasitemia já haver ocorrido.

Aproximadamente metade dos cães deste estudo revelaram soropositividade à RIFI, superior à frequência observada por Trapp et al. (2006b) em cães de população hospitalar de Londrina. Ribeiro et al. (1990) encontraram soropositividade superior à observada nesta pesquisa em cães atendidos em hospital de Belo Horizonte à RIFI, enquanto Spiewak (1992), estudando cães atendidos em clínicas e cães de rua da mesma cidade, observou maior soropositividade na última categoria, e atribuiu esse achado à maior exposição dos cães errantes aos carrapatos vetores de *B. canis*.

A frequência de cães infectados por *B. canis vogeli* à PCR na população hospitalar estudada pode ser considerada baixa, apesar de 51,4% (161/313) dos animais amostrados encontrar-se infestados por carrapatos no momento da coleta. Resultados semelhantes foram encontrados M'ghirbi e Bouattour (2008) que obtiveram DNA de *B. canis vogeli* amplificado em poucas amostras sanguíneas, embora a maioria dos animais estivessem infestados por *R. sanguineus* à coleta. Brown et al. (2006) ressalta que ensaios de PCR podem subestimar a prevalência de *B. canis vogeli* quando o grau de parasitemia estiver abaixo do nível de detecção. Além disso, em áreas endemicamente estáveis onde, em condições ideais, há grande quantidade de carrapatos vetores infectados, os animais jovens obtêm imunidade passiva e os hospedeiros adquirem uma tolerância natural e relacionada à idade contra a infecção, o impacto da doença pode tornar-se baixo (Uilenberg, 2006). Isso nos leva a acreditar que muitas vezes os cães infectados por *B. canis vogeli* foram levados a atendimento clínico por outros distúrbios e a detecção do DNA do agente foi um achado ocasional, fato também sugerido por Cardoso et al. (2008).

O sequenciamento genético de amostras positivas para *B. canis vogeli* à PCR revelou similaridade de 99% com isolados de Recife (FJ588003.1), Taiwan (EF180055.1) e Cabo Verde (C395377.1). Pouco tempo antes da primeira caracterização molecular de *B. canis vogeli* (Passos et al. 2005) realizadas a partir de amostras de São Paulo e Minas Gerais, Bicalho et al. (2002) produziram infecção experimental com amostras de *B. canis* isoladas da região mineira e observaram baixa parasitemia associada à ausência de manifestações clínicas, o que os levou a concluir que as amostras presentes naquele meio exibiam baixa patogenicidade. Apesar da baixa homologia com este isolado de Minas Gerais (AY371196.1), podemos inferir que as amostras de *B. canis vogeli* isoladas e caracterizadas neste estudo também exibiam baixa patogenicidade, considerando a ocorrência de variações de cepas entre regiões, as frequências e achados clinicopatológicos descritos neste estudo.

Houve grande variação na idade dos animais acometidos, como também observado em estudo realizado por Solano-Gallego et al. (2008), porém esta variável não representou fator de risco à soropositividade para babesiose canina, como também observado por Maia et al. (2007). Costa-Júnior et al. (2009) e Trapp et al. (2006b), entretanto, observaram menor soroprevalência para *B. canis vogeli* em animais com idade inferior a dois anos e um ano, respectivamente. O gênero também não alterou o risco dos animais serem soropositivos para *B. canis*, como verificado em estudos conduzidos por Costa-Júnior et al. (2009), Maia et al. (2007) e Trapp et al. (2006b). De maneira similar, o padrão racial não constituiu fator de risco à soroprevalência para *B. canis*, como observado por Solano-Gallego et al. (2008) e Costa-Júnior et al. (2009). Estudo conduzido por Maia et al. (2007), entretanto, relevou maior soroprevalência de *B. canis vogeli* entre cães sem raça definida, os quais teriam 1,8 vezes mais chances de adquirir babesiose do que animais de raça pura.

Sabe-se que *B. canis vogeli* é a menos patogênica das subespécies de *B. canis* (Solano-Gallego et al. 2008) e normalmente produz desde uma infecção subclínica a doença relativamente branda (Cacció et al. 2002), o que talvez justifique a escassez de informações sobre as anormalidades clinicopatológicas observadas em cães com babesiose canina causada por esta subespécie (Solano-Gallego et al. 2008). As alterações exibidas com maior frequência pelos animais soropositivos foram inespecíficas, como normalmente descrito para a doença (Bourdoiseau 2006; Dantas-Torres e Figueredo 2006; Furlanello et al. 2005). Entretanto, por serem comuns a outras enfermidades e, conseqüentemente, em animais de população hospitalar, não representaram fator de risco à soropositividade para *B. canis*, exceto a presença de carrapatos, como previamente observado por Trapp et al. (2006b) e Costa-Júnior et al. (2009). Segundo Martinod et al. (1985), animais infectados que possuem anticorpos anti-*B. canis* geralmente não apresentam sinais clínicos da doença por um período de até um ano, o que poderia justificar a elevada soropositividade aliada à escassez de sinais clínicos associados à doença observada neste estudo. Além disso, como os sinais clínicos mais frequentes em cães soropositivos neste estudo foram inespecíficos e comuns a muitas enfermidades, reforçamos a necessidade de adoção de métodos de diagnóstico adequados que proporcionem a identificação do agente para implementação de terapêutica adequada.

Postula-se que, na infecção por *B. canis vogeli*, o parasita está presente sem evidenciar alterações clínicas até que outros eventos ocorram, como esplenectomia e doenças concomitantes (Taboada e Lobetti 2006; Solano-Gallego et al. 2008), entretanto ainda há escassez de informações sobre a associação de babesiose causada por esse agente e condições imunossupressoras ou doenças concorrentes em cães adultos (Solano-Gallego et al. 2008). Apesar de ser comum a co-infecção entre *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* (Suksawat et al.

2001), houve apenas um caso de co-infecção entre *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. ao esfregaço sanguíneo, porém é necessário destacar que este método apresenta as limitações de diagnóstico já relacionadas, podendo subestimar o número de casos (Castro et al. 2004; Brown et al. 2006). Vale ressaltar que, em estudo conduzido por de Caprariis et al. (2010), as alterações clínicas e hematológicas ocorreram principalmente em animais co-infectados por *B. canis vogeli* e *A. platys* quando comparados àqueles infectados apenas por *B. canis vogeli*, revelando que a co-infecção entre os agentes pode agravar o quadro clínico e deve ser considerada à realização do diagnóstico em áreas endêmicas. Alguns estudos revelaram que os cães infectados pelo agente frequentemente exibiam patologias concomitantes severas que provavelmente contribuíram para a ação patogênica do agente (Carli et al. 2009), como a leishmaniose visceral canina (Solano-Gallego et al. 2008). É importante ressaltar que esta enfermidade é endêmica em cães e humanos da cidade de Teresina (Werneck et al. 2008), o que foi evidenciado neste estudo pela alta frequência de cães em que foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* spp., mesmo não sendo a pesquisa em esfregaços de sangue periférico considerada a ideal para visualizar o parasita (Laurenti 2009).

Apesar das alterações hematológicas terem sido bastante variáveis nos cães soropositivos deste estudo, como também observado por Dell Porto et al. (1993), a anemia foi a anormalidade mais frequente observada no hemograma desses animais. Supomos que a alta frequência de distúrbios clínicos que cursam com anemia, como erliquiose, anaplasiose e leishmaniose canina, não permitiu que a análise estatística detectasse associação entre este parâmetro e a babesiose canina. Além disso, anemia nem sempre é vista em animais sororeagentes para *B. canis*, como observado por Taboada e Merchant (1997), os quais não detectaram anormalidades hematológicas em adultos assintomáticos sorologicamente positivos. Corroborando esses achados, em estudo conduzido por Costa-Júnior et al. (2009) em cães saudáveis, hematócrito abaixo de 30% não se constituiu um fator de risco relacionado à soroprevalência de *B. canis vogeli*. É importante ressaltar que, uma vez que os cães com contagem de hemácias e hematócrito dentro da normalidade foram mais propensos à soropositividade para babesiose, aqueles animais com estes parâmetros normais não devem ter excluída a possibilidade de infecção por *B. canis*.

Embora não tenha constituído fator de risco para soropositividade a *B. canis* neste estudo, a trombocitopenia foi um achado frequente nos cães sororeagentes. Interessantemente, em estudo conduzido com cães de população hospitalar, Trapp et al. (2006b) observaram que aqueles animais apresentando sagração superficial tiveram 12,3 vezes mais chance de exposição prévia a *B. canis vogeli*. Esses dados reforçam a necessidade do diagnóstico diferencial das hemoparasitoses, uma vez que *B. canis*, *E. canis* e *A. platys* pode originar trombocitopenia em cães (Macieira et al. 2005; Ueno et al. 2009).

As alterações leucocitárias foram variáveis entre animais soropositivos e não constituíram fator de risco para a babesiose canina, como também observado por Dell Porto et al. (1993), cujo estudo não detectou associação entre alterações leucocitárias específicas e animais sororeagentes à RIFI. Em estudo conduzido por Zygnier et al. (2007), 7,2% dos animais com babesiose canina exibiram linfopenia, percentual semelhante ao observado neste estudo. Segundo Meinkoth e Clinkenbeard (2000), eosinopenia é um achado frequente em processos inflamatórios ou infecciosos agudos e embora não esteja vinculada diretamente aos animais soropositivos do estudo, pode estar associada à enfermidades concorrentes comuns, como a erliquiose canina em que esta alteração leucocitária é comum (Mendonça et al. 2005).

A alta frequência de animais soropositivos aliada à discreta detecção do agente à PCR e ao esfregaço sanguíneo observados neste estudo, nos permitem concluir que a babesiose é endêmica em cães do Estado do Piauí, nordeste do Brasil, onde a doença parece não afetar severamente a saúde dos cães infectados. Além disso, a detecção do DNA de *B. canis vogeli* apresenta-se como ferramenta de diagnóstico da doença promissora em áreas endêmicas, uma vez que apresenta sensibilidade superior à pesquisa direta e a presença de anticorpos não implica em prejuízos à sanidade do animal.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí pela concessão de auxílio financeiro como bolsa de estudos à pós-graduanda Juliana Braga.

Referências

Assis CB (1993) Estudo de aspectos hematológico, bioquímico e imunológico em cães não esplenectomizados e esplenectomizados inoculados com *Babesia canis*. Tese, Universidade Estadual Paulista

Bicalho KA, Passos LMF, Ribeiro MFB (2002) Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec 54: 546-548

Bourdeau P, Guelfi JF (1995) Canine babesiosis due to *Babesia canis*. Point Vet 27:103-116

Bourdoiseau G (2006) Canine babesiosis in France. Vet Parasitol 138: 118–125

Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, Roberts TK, Martin AR, Brown CS, Irving R (2006) 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 Vet J 84:321-325

Cacciò SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili, V, Marinculic A, Baric RR, Slemenda SB, Pieniazek NJ (2002) Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. Vet Parasitol 106: 285–292

Cardoso L, Costa A, Tuna J, Vieira L, Eyal O, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G (2008) *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. Vet Parasitol 156;199–204

Carli E, Tasca S, Trotta M, Furlanello T, Caldin M, Solano-Gallego L (2009) Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. Vet Parasitol. doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.002

- Carvalho CCD, Carvalho HMA, Sales LM, Silva RL, Figueiredo JF, Furtado JH, Castro JAF (2001) Prevalência de *Babesia canis* em cães de rua da cidade Teresina – Piauí. X Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Anais... Teresina: UFPI, 2001. 178p
- Castro MB, Machado RZ, Aquino LPCT, Alessi AC, Costa MT (2004) Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol* 119:73-96
- Centro Panamericano de Zoonoses (1973) Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades cronicas en el ganado. Ramos Mejia, Buenos Aires
- Costa-Júnior LM, Ribeiro MFB, Rembeck K, Rabelo EML, Zahler-Rinder M, Hirzmann J, Pfister K, Passos LMF (2009) Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Res Vet Sci* 86: 257–260
- Dantas-Torres F (2008a) Causative agents of canine babesiosis in Brazil. *Prev Vet Med* 83:210-211
- Dantas-Torres F (2008b) Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*. doi:10.1186/1756-3305-1-25
- Dantas-Torres F, Figueredo LA (2006) Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Vet Parasitol* 141:197-203
- De Caprariis D, Dantas-Torres F, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, Otranto D (2010) Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet Microbiol*. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.006
- Dell Porto A, Oliveira MR, Miguel O (1993) *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. *Rev Bras Parasitol Vet* 2: 37-40
- Duarte SC, Linhares GFC, Romanowsky TN, Silveira Neto OJ, Borges LMF (2008) Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet Parasitol* 152:16-20
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L (2005) Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol* 134: 77–85

- Gopegui R, Penalba B, Goicoa A, Espada Y, Fidalgo LE, Espino L (2007) Clinicopathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *Vet. J.* 174:129–132
- Guimarães JC, Albernaz AP, Machado JA, Junior OAM, Garcia LNN (2004) Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, RJ. *Rev Bras Parasitol Vet* 13(Suppl.1):229
- IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (1987) Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina. IICA, San José
- Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ (2007) PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol* 144:20-27
- Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biom* 33:159-174
- Laurenti MD (2009) Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bol Epidemiol Paulista* 6:13-23
- M'ghirbi Y, Bouattour A (2008) Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet Parasitol* 152:1–7
- Macieira DB, Messick J, Cerqueira ADM, Freire I, Linhares G, Almeida N, Almosny N (2005) Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Clin Pathol* 34:44–48
- Maia MG, Costa RT, Haddad JPA, Passos LMF, Ribeiro MFB (2007) Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Prev Vet Méd* 79:155–162
- Martin AR, Dunstan RH, Roberts TK, Brown GK (2006) *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Exp Parasitol* 112:63–65
- Martinod S, Brossard M, Moreau Y (1985) Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. *J Parasitol* 71:269–273
- Medeiros RM (2004) Estudo Agrometeorológico para o Estado do Piauí. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Piauí, Teresina
- Meinkoth JH, Clinkenbeard KD (2000) Normal Hematology of the Dog. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (ed.) *Schalm's veterinary hematology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp.1057-1063

- Mendonça CS, Mundim AV, Costa AS, Moro TV (2005) Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosci J* 21:167-174
- Miranda FJB, Albernaz AP, Melo Jr. AO, Machado JÁ (2008) Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ. *Cienc Anim Bras* 9:238-241
- O'Dwyer LH, Lopes VVA, Rubini AS, Paduan KS, Ribolla PEM (2009) *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 18:23-26
- Passos LM, Geiger SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahler-Rinder M (2005) First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet Parasitol* 127:81-85
- Ribeiro MFB, Passos LMF, Lima JD, Guimarães AM (1990) Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zoot* 42:511-517
- Shaw SE, Dayb MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB (2001) Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol* 17: 74-80
- Silva LS (2010) Erliquiose e Anaplasmosse canina em Teresina, Piauí. Dissertação, Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.
- Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T (2008) *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol* 157:211-221
- Spiewak G (1992) Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por *Babesia canis*, em cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais
- Suksawat J, Xuejie Y, Hancock SI, Hegarty BC, Nilkumhang P, Breitschwerdt EB (2001) Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *J Vet Intern Med* 15:453-462
- Taboada J, Lobetti R (2006) Babesiosis. In: Greene CE (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 722-736
- Taboada J, Merchant SR (1997) Infecções por protozoários e por outras causas. In: Ettinger SJ, Feldman (ed) *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, 4ª ed. São Paulo: Manole, pp 554-572
- Todorovic RA (1975) Serological diagnosis of babesiosis: A review. *Trop Anim Health Prod* 7:1-14.

Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, de Moraes HS (2006a) *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. Vet Parasitol 141:177-180

Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, Freire RL, Amude AM, de Moraes HS (2006b) Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a Hospital population. Vet Parasitol 140: 223-230

Ueno TEH, Aguiar DM, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Ribeiro MG, Paes AC, Megid J, Labruna MB (2009) *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 18:57-61

Uilenberg G (2006) Babesia - A historical overview. Vet Parasitol 138: 3-10

Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM, Spanjer AA (1989) Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. Vet. Q. 11: 33-40

Vercammen F, De Deken R, Maes L (1997) Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. Vet Parasitol 68:51-55

Vidotto O, Trapp SM (2004) Babesiose canina. Res Bras Parasitol Vet v.13(Suppl.1)

Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvêa MV, Costa CHN, Carvalho FAA (2008) Avaliação da efetividade das estratégias de controle da Leishmaniose Visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial-2004. Epidemiol Serv Saude Bras 17(Suppl.2):57-96

Zahler M, Schein E, Rinder H, Gothe R (1998) Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. Parasitol Res 84:544-548

Zygner W, Rapacka G, Gójska-Zygner O, Długosz E, Wedrychowicz H (2007) Biochemical abnormalities in serum of dogs infected with large *Babesia* in Warsaw (Poland). Pol J Vet Sci 10:245-253

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDULLAHI, S. U., MOHAMMED, A. A., TRIMNEL, A. R. et al. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **J Small Anim Pract**, v.31, p.145–147, 1990.

ABOGE, G. O.; JIA, H.; KURIKI, K. et al. Molecular characterization of a novel 32-kDa merozoite antigen of *Babesia gibsoni* with a better diagnostic performance by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitol**, v.134, p.1185-1194, 2007.

ADACHI, K.; TATEISHI, M.; HORII, Y. et al. Immunologic characteristics of anti-erythrocyte membrane antibody produced in dogs during *Babesia gibsoni* infection. **J Vet Med Sci**, v.57, p.121–123, 1995.

AHMED, J.S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitol Res**, v.88, p.48-50, 2002.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 135p.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clin Vet**, n.19, p.31-38, 1999.

ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; ZAPPA, V. *Babesia canis*: relato de caso. **Rev Cien Eletr Med Vet**, v.7, p. 2009.

BASTOS, C. V., MOREIRA, S. M., PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Ann. New York Acad Sci**, v.1026, p.158–160, 2004.

BIRKENHEUER, A. J. M. G.; LEVY, K. C.; SAVARY, R. B. et al. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **J Amer Anim Hosp Assoc**, v.35, p.125-128, 1999.

BOBADE, P. A.; ODUYE, O. O.; AGHOMO, H. O. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. **Rev Elev Med Vet Pays Trop**, v.42, p.211–217, 1989.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.33, p.885-904, 2003.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J. et al. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet Parasitol**, v.57, p.61-74, 1995.

BOUNOUS, D. I.; HOSKINS, J. D.; BOUDREAUX, M. K. O Sistema Hematopoético. In: HOSKINS, J. D. *Pediatria Veterinária*. São Paulo: Manole, p.317-351, 1993.

BOURDOISEAU, G. Canine babesiosis in France. **Vet.Parasitol**, v.138, p.118–125, 2006.

BRANDÃO, L P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina – Revisão. **Clin Vet**, v.41, p.50-59, 2002.

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K.; MYIASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Vet Parasitol**, v.114, p.253–265, 2003.

CARLI, E.; TASCA, S.; TROTTA, M. et al., Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Vet Parasitol**. (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.002

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **J Eukaryot Microbiol**, v.46, p.298–303, 1999.

CHAUVIN, A.; OREAU, E. M.; ONNET, S. B. et al. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Vet Res**, v.40, p.37, 2009.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K. et al. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Res Vet Sci**, v.86, p.257–260, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasit Vectors**, v.83, p.210–211, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, p.64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Vet Parasitol**, v.141, p.197-203, 2006.

DASEY, M. J.; MARTINEZ, H.; RAIMONDO, T. et al. Septic shock due to babesiosis. **Clin Infect Dis**, v.33, p.37–38, 2001.

DE CAPRARIIS, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G. et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Vet Microbiol** (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.006

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. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.2, p.37-40, 1993.

FINIZIO, A.-L.; KLEUSKENS, J. A. G. M.; VAN DE CROMMERT, J. et al. Soluble parasite antigens from *Babesia canis* do not directly activate the kallikrein system in dogs infected with *Babesia canis*. **Vet Parasitol** (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.005

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med**, v.13, p.194-201, 1999.

FREEMAN, M. J.; KIRBY, B. M.; PANCIERA, D. L. et al. Hypotensive shock syndrome associated with acute *Babesia canis* infection in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v.204, p.94–96, 1994.

FRITZ, C. L. Emerging Tick-borne Diseases. **Vet Clin Small Anim**, v.39, p.265–278, 2009.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M. et al. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Vet Parasitol**, v.134, p.77–85, 2005.

GUIMARÃES, J. C.; ALBERNAZ, A. P.; MACHADO, J. A.; JUNIOR, O. A. M.; GARCIA, L. N. N. Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, RJ. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.13, (Supl.1):229, 2004.

- HAGIWARA, M. K.; HOLZCHUH, M. P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*: Avaliação do leucograma durante a evolução da doença. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.39, p.745–755, 1987.
- HAGIWARA, M. K.; YAMAGA, A. S. Infecção de cães por *Babesia canis*. Estudo das alterações da coagulação sanguínea. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.39, p.758–770, 1987.
- HARVEY, J. W.; TABOADA, J.; LEWIS, C. Babesiosis in a litter of pups. **J Am Vet Med Assoc**, v.192, p.1751–1752, 1988.
- HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R. et al. Babesiosis. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p.451–469, 2000.
- JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. **Vet Parasitol**, v.138, p.126-139, 2006.
- JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; MUHLNICKEL, C. J. et al. Two Species of Canine Babesia in Australia: Detection and Characterization by PCR. **J Parasitol**, v.89, p.409–412, 2003.
- KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C. et al. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. **J Clin Microbiol**, v.37, p.2631–2638, 1999.
- LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet**, v.13, 2004. Suplemento 1.
- LABRUNA, M.; PEREIRA, M. Carrapato em cães no Brasil. **Clin Vet**, n.30, p.24-32, 2001.
- LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; DE MORAIS, H. S. et al. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. **J Vet Intern Med**, v.15, p.445-452, 2001.
- LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Iowa State University Press, Ames, IA. 1985.
- LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **J Vet Intern Med**, v.16, p.63-68, 2002.

LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. **Comp Cont Educ Pract Vet**, v.20, p.418–430, 1998.

LOULY, C. C. B. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no canil da polícia militar do município de Goiânia-Goiás, Brasil**. 2003. 47f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.

MACINTIRE, D. K.; BOUDREAUX, M. K.; WEST, G. D. et al. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **J Am Vet Med Assoc**, v.220, p.325– 329, 2002.

MACKENSTEDT, U.; GAUER, M.; MEHLHORN, H. et al. Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. **Parasitol Res**, v.76, p.199–206, 1990.

MAEGRAITH, B.; GILLES, H. M.; DEVAKUL, K. Pathological processes in *Babesia canis* infections. **Z Tropenmed Parasitol**, v.8, p.485–514, 1957.

MAHONEY, D. F. Babesia of domestic animals. In: KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, p.1-76, 1977.

MAIA, M. G. **Aspectos epidemiológicos da babesiose canina em área semi-árida do estado de Minas Gerais**. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

MAIA, M. G.; COSTA, R. T.; HADDAD, J. P. A. et al. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. **Prev Vet Med**, v.79, p.155–162, 2007.

MARTINOD, S.; BROSSARD, M.; MOREAU, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. **J Parasitol**, v.71, p.269–273, 1985.

MASUDA, T.; BABA, E.; ARAKAWA, A. Relapse of canine babesiosis after prednisolone treatment. **Mod Vet Pract**, v.64, p.931–932, 1983.

MATIJATKO, V.; KIŠ, I.; TORTI, M. et al. Systemic inflammatory response syndrome and multiple dysfunction syndrome in canine babesiosis. **Veterinarski Arhiv**, v.80, p.611-626, 2010.

MATSUU, A.; ONO, S.; IKADAI, H. et al. Development of a SYBR green Real-time Polymerase Chain Reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. **J Vet Diagn Invest**, v.17, p.569–573, 2005.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1504p.

MEDEIROS, R. M. **Estudo Agrometeorológico para o Estado do Piauí**. Teresina: Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Piauí, 2004. 113p.

MOTTIN, V. D.; SILVA, C. C.; CHIMINAZZO, C. et al. Ocorrência de *Babesia canis*, Piana & Galli –Valeiro, 1895, em esfregaços sangüíneos periféricos de cães no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: EXPOGRAMADO, 2008.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 428p.
OHNISHI, T.; UEDA, K.; HORIE, M. et al. Serum hemolytic activity in dogs with *Babesia gibsoni*. **J Parasitol**, v.76, p.564–567, 1990.

OLICHESKI, A. T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2003. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Doenças Parasitárias). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

ONISHI, T.; UEDA, K.; HORIE, M. et al. Serum haemolytic activity in dogs infected with *Babesia gibsoni*. **J Parasitol**, v.19, p.245–254, 1990.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends Parasitol**, v.25, p.157–163, 2009a.

OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. **Trends Parasitol**, v.25, p.228–235, 2009b.

OZAKI, L. S. Babesia in domestic animals: molecular biological tools for studying their taxonomy and life cycle. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, 1996. Suplemento.

PAGE, R. L. Hematologia/Oncologia. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: Clínica de pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Rocca, p.165-245, 1998.

PALMAS, C., BORTOLETTI, G., CONCHEDDA, M. et al. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parassitol**, v.43, p.29–35, 2001. Suplemento 1.

PASSOS, L. M.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet Parasitol**, v.127, p.81–85, 2005.

PERSING, D. H.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, W. F. et al. Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. **J Clin Microbiol**, v.30, p.2097-103, 1992.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D. et al. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v.42, p.511-517, 1990.

RIOS, L.; ALVAREZ, G.; BLAIR, S. Estudo sorológico e parasitológico e relato do primeiro caso de babesiose humana na Colômbia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, p.493-498, 2003.

SÁ, A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H. et al. Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* From Naturally Infected Brazilian Dogs. **Intern J Appl Res Vet Med**, v.4, p.163-168, 2006.

SCHETTERS, TH. P. M.; KLEUSKENS, J.; SCHOLTES, N. et al. Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. **Vet Parasitol**, v.73, p. 35-41, 1997.

SCHETTERS, TH. P. M.; KLEUSKENS, J. A. G. M.; SCHOLTES, N. C. et al. Parasite localisation and dissemination in the *Babesia*-infected host. **Ann Trop Med Parasitol**, v.92, p.513–519, 1998.

SCHETTERS, TH.P.M.; KLEUSKENS, J.; VAN DE CROMMERT, V. et al. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. **Vet Parasitol**. (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.012

SHAW, S. E.; DAYB, M. J.; BIRTLESC, R. J. et al. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol**, v.17, p.74-80, 2001.

SILVA, L. S. **Erliquiose e Anaplasmosse canina em Teresina, Piauí**. Dissertação, Universidade Federal do Piauí. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

SLOSS, M. W.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Editora Manole, 1999. 198p.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E. et al. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Vet Parasitol**, v.157, p.211–221, 2008.

TABOADA, J. Babesiosis. In: Greene, C.E. (ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: Saunders, pp. 473–481, 1998.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, p.554-572, 1997.

TODOROVIC, R. A. Serological diagnosis of babesiosis: A review. **Trop Anim Health Prod**, v.7, p.1-14, 1975.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O. et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Vet Parasitol**, v.141, p.177–180, 2006.

UILENBERG, G. Babesia—A historical overview. **Vet Parasitol**, v.138, p.3–10, 2006.

UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F.; PERIE, N. M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet Q**, v.11, p.33-40, 1989.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

VALLI, V. E. O. Hematopoietic system. In: MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 3v., p.107-324, 2007.

VERCAMMEN, F., DE DEKEN, R., MAES, L. Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*. **Vet Parasitol**, v.63, p.195–198, 1996.

VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. **Vet Parasitol**, v.68, p.51-55, 1997.

VERDIDA, R. A.; HARA, O. A.; XUAN, X. et al. Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. **J Vet Med Sci**, v.66, p.1517–1521, 2004.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Vet Parasitol**, v.138, p.147–160, 2006.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.13, 2004. Suplemento 1.

WELZL, C.; LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S. et al. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. **J S Afr Vet Assoc**, v.72, p.158–162, 2001.

WLOSNIIEWSKI, A.; LERICHE, M. A.; CHAVIGNY, C. et al. Etude du portage asymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, v.20, p.75–86, 1997.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H. et al. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol Res**, v.84, p.544-548, 1998.

APÊNDICES

Babesiose canina em Teresina, Piauí

FICHA DO ANIMAL

IDENTIFICAÇÃO

ANIMAL Nº: _____ NOME: _____ RG: _____ SEXO: _____
 _____ COR: _____ RAÇA: _____
 PESO: _____ IDADE: _____
 PROPRIETÁRIO: _____ FONE: _____
 ENDEREÇO: _____
 SUSPEITA CLÍNICA: _____

HISTÓRICO DO ANIMAL

PERGUNTA	SIM	NÃO	Observações
Tem acesso à rua?			
Convive com outros animais?			
Sadios?			
Histórico de carrapatos?			

EXAME CLÍNICO

ALTERAÇÃO CLÍNICA	SIM	NÃO	Observações
Sem alterações			
Ectoparasitas			
Febre			
Apatia			
Anorexia/hiporexia			
Perda de peso			
Desidratação			
Edema			
Mucosas hipocoradas			
Icterícia			
Petéquias			
Hemorragia nos coxins			

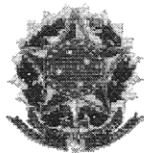
Esplenomegalia			
Hepatomegalia			
Linfadenopatia			
Hemoglobinúria			
Alterações nervosas			
Outras			

RESULTADO DOS EXAMES

TESTE	POSITIVO	NEGATIVO	Observação
PARASITOLÓGICO			
RIFI			
PCR			

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 05 de Outubro de 2010

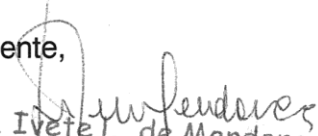
Ao (A)

Prof (a): Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-CCA/UFPI

Sr. (a) Pesquisador (a)

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado: **“Babesiose canina em Teresina-Piauí: epidemiologia e patologia.”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO sob o nº. 048/2010**, Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Parâmetros hematológicos e valores de referência para hemograma de cão, segundo Meinkoth; Clinkenbeard (2000)

PARÂMETRO	VALOR DE REFERÊNCIA
Hemácias x10 ⁶ / µL	5,5-8,5
Volume Globular (%)	37-55
VCM (fL)	60-77
Hgb (g/dL)	12-18
CHCM (%)	32-36
Leucócitos x10 ³ / µL	6.000-17.000
Basófilo / µL	Raros
Eosinófilo / µL	100-1.250
Bastonetes / µL	0-300
Neutrófilos / µL	3.000-11.500
Linfócito / µL	1.000-4.800
Monócito / µL	150-1.350
Plaquetas x 10 ³ / µL	200.000-500.000