

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *BABESIA* SPP. EM CÃES  
DA REGIÃO PERIURBANA DE BRASÍLIA, DISTRITO  
FEDERAL**

**MARTA FREITAS VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *BABESIA* SPP. EM CÃES DA REGIÃO PERIURBANA  
DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

**MARTA FREITAS VASCONCELOS**

**ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 022/2010**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *BABESIA* SPP. EM CÃES DA ÁREA PERIURBANA  
DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

**MARTA FREITAS VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL**

**APROVADA POR:**

---

GIANE REGINA PALUDO, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)  
(ORIENTADOR)

---

ARLETE DELL'PORTO, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

---

NÁDIA REGINA P. ALMOSNY, MVD, PhD (Universidade Federal Fluminense - UFF)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

**BRASÍLIA/DF, 08 de FEVEREIRO de 2010**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

VASCONCELOS, M.F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da área periurbana de Brasília, Distrito Federal.** Brasília:Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 63 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Vasconcelos, Marta Freitas  
Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da área periurbana de Brasília, Distrito Federal / Marta Freitas Vasconcelos orientação de Giane Regina Paludo– Brasília, 2010. 85p.: il.  
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010.  
1. *Babesia* spp.      2. Cães.      3. Hematologia.  
4. Bioquímica   5. PCR.   6. Sub-espécies I. Vasconcelos, M.F. II. Estudo da infecção por *Babesia* sp. em cães da área periurbana de Brasília, Distrito Federal.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

## **AGRADECIMENTOS**

Inicio meus agradecimentos àquele que eu nunca vi, mas conheço bastante. Com ele, compartilhei meus momentos de solidão e tristeza, mas também, os de alegria e felicidade. Com ele, e muitas vezes só com ele, participei todos os piores e os melhores momentos da minha vida; e por isso eu te agradeço meu Deus.

Aos meus pais, pelo apoio e confiança na minha capacidade, por estarem ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, estrelas da minha vida! Pelos exemplos de vida e conquistas, por estarem ao meu lado incondicionalmente.

À minha orientadora, Professora Dra. Giane Regina Paludo, por ser mãe e orientadora, pelo apoio, pela amizade e por estar do meu lado em todos os momentos durante esta caminhada.

Ao meu noivo, Rodrigo Bittencourt, pela sua importância imensurável, pela paciência, compreensão; por estar ao meu lado compartilhando todos os momentos, pela amizade sincera, o olhar mais verdadeiro e o amor incondicional.

À Aurelina, Francisco e Carmem por serem “anjos” da minha vida.

Às meninas dos laboratórios e do Hvetinho, pelo apoio, amizade, lanches e almoços, idas à Fercal, por todos os momentos vividos ao longo destes anos.

Às minhas amigas – Tati, Fê, Anahí, Mirna, Vanessa, Cris e Karla - que sempre estiveram ao meu lado, pelas risadas, conselhos, amizade, por todos os momentos que passamos juntas.

Aos meus cunhados, especialmente Henrique e Leonardo, por todo carinho, apoio e confiança depositada.

À Salvina e seu Aurino, pelas comidinhas gostosas que preparam ao longo desses anos, pelo amor e atenção oferecida.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação da Universidade Católica de Brasília pelos resultados de seqüenciamentos.

Aos agentes comunitários e toda a população da Fercal e a Lívia, proprietária do abrigo de cães do Lago Oeste, que colaboraram com o estudo nos abrindo a porta sempre com boa vontade. Este trabalho não teria sido realizado sem vocês.

Às minhas amigas e amigos, orientadas de PIBIC e estagiários: Fabíola, Fernanda, Maiana, Maia, Andréa, Ana Paula e Rodrigo pela amizade, ajuda incansável, conversas e risadas ao longo deste trabalho.

Aos professores Dr. Márcio Botelho de Castro, Dra. Arlete Dell'Porto e Dra. Ângela Patrícia pelo carinho dispensado durante esses anos.

À Professora Dra. Nádia R.P. Almosny pelo apoio e presença em minha avaliação.

À Universidade de Brasília e Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e todos os professores e funcionários que fizeram parte da minha vida ao longo desses anos.

À Capes e FINATEC pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Os meus sonhos nada mais são do que objetivos a serem alcançados. Alguns estão a um passo, outros, mais distantes, além do horizonte. Distância pela qual minhas pernas fortes me guiarão, com paciência e clareza. E se no caminho houver algo, que o tempo me obste atingir não tem problema. Meus sonhos são tão belos, que do meu ofego, farei descanso, e do meu suor, farei vitória.”

(Autor desconhecido)

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiii
PREFÁCIO	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	
Introdução	1
Referencial Teórico	2
Objetivos	11
Referências	12
CAPÍTULO II	
Título do Artigo	19
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados	29
Discussão	48
Conclusões	55
Referências	56
CAPÍTULO III	
Considerações Finais	62
ANEXOS	64



## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>TABELA 1</b>	Sequências de oligonucleotídeos utilizados para PCR	23
<b>TABELA 2</b>	Resultados esperados dos tamanhos dos fragmentos de DNA (pb) na PCR e restrição enzimática utilizando as enzimas TaqI e HinfI para cada espécie de <i>Babesia</i>	25
<b>TABELA 3</b>	Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR (oligonucleotídeo 455-479-F e 793-772-R) por local estudado	30
<b>TABELA 4</b>	Número total e porcentagem de animais positivos para <i>Babesia</i> spp no esfregaço sanguíneo e na PCR na região da Fercal e no abrigo do Lago Oeste	31
<b>TABELA 5</b>	Co-infecções dos animais positivos para <i>Babesia</i> spp	31
<b>TABELA 6</b>	Análise estatística dos hemogramas completos e das bioquímicas séricas dos animais positivos e negativos da Fercal e lago Oeste	37
<b>TABELA 7</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico nos cães positivos e negativos para a infecção por <i>Babesia</i> spp. do abrigo do Lago Oeste	38
<b>TABELA 8</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por <i>Babesia</i> spp. da Fercal	39
<b>TABELA 9</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por <i>Babesia</i> sp. das duas localidades	40
<b>TABELA 10</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados pelos animais positivos somente para <i>Babesia</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Babesia</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Babesia</i> sp. (G3) do abrigo do Lago Oeste	41
<b>TABELA 11</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos somente para <i>Babesia</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Babeisa</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Babesia</i> sp. (G3) da Fercal	42
<b>TABELA 12</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos somente para <i>Babesia</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Babesia</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Babesia</i> sp. (G3) nas duas localidades	43
<b>TABELA 13</b>	Freqüência das alterações hematológicas e bioquímicas dos animais infectados somente com <i>Babesia</i> spp. sem co-infecção com <i>Hepatozoon</i> , <i>Ehrlichia</i> e <i>Leishmania</i> (G1)	44

<b>TABELA 14</b>	Número total e porcentagem de animais positivos para <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Babesia canis rossi</i>	45
<b>TABELA 15</b>	Número total e porcentagem de animais positivos <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Babesia canis rossi</i> na região da Fercal e no abrigo do Lago Oeste	45
<b>TABELA 16</b>	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados nos animais infectados com <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Babesia canis rossi</i>	46
<b>TABELA 17</b>	Frequência das alterações hematológicas e bioquímicas dos animais infectados <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Babesia canis</i>	47

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> <i>Babesia</i> spp. em eritrócito de cão (aumento de 100X-coloração panótico)	29
<b>FIGURA 2</b> Resultado da PCR para o gênero <i>Babesia</i> sp., utilizando os oligonucleotídeos 455-479-F e 793-772-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos e 8: animal negativo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)	30
<b>FIGURA 3</b> Gel resultante da eletroforese da PCR para o gênero <i>Hepatozoon</i> sp. utilizando os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle positivo; 3: controle negativo (água); 4: animal positivo e 5: animal negativo. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)	32
<b>FIGURA 4</b> Resultado da PCR para o gênero <i>Ehrlichia</i> sp. utilizando os oligonucleotídeos DSB 330 e DSB 728 em amostras de sangue total. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen ®); 2: controle negativo(água); 3 e 4: animais negativos; 5, 6: animais positivos; 7: controle positivo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)	32
<b>FIGURA 5</b> Resultado da PCR para o gênero <i>Leishmania</i> sp. utilizando-se os oligonucleotídeos LFW e LBW1 e 2. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle negativo (água) 3: controle positivo; 4 e 5: animais positivos. Gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0.01% (p/v)	33
<b>FIGURA 6</b> Resultado da PCR para o gênero <i>Babesia</i> sp. utilizando-se os oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle positivo; 3,4,5,6,7: animais positivos; 8: controle negativo (água). Gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)	34
<b>FIGURA 7</b> Resultado da digestão enzimática com as enzimas <i>Taq I</i> e <i>Hinf I</i> , dos produtos da PCR (oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R). Legenda: Superior: Digestão enzimática com a enzima <i>Taq I</i> , 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle positivo para <i>Babesia canis vogeli</i> 3,4,5,6 e 7: animais positivos para digestão enzimática. Inferior: Digestão enzimática negativa para a enzima <i>Hinf I</i> , 1A: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2A: controle positivo; 3A,4A,5A,6A e 7A: animais positivos para <i>Babesia canis vogeli</i> . Gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)	34
<b>FIGURA 8</b> Resultado da digestão enzimática com as enzimas <i>Taq I</i> e <i>Hinf I</i> , dos	35

produtos da PCR (oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R).  
Legenda: À esquerda, digestão enzimática negativa para enzima *Taq I*,  
1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); 2,3,e 4: amostras  
negativas para enzima *Taq I*. À direita, digestão enzimática positiva  
com a enzima *Hinf I*, 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen  
®); 2,3 e 4: amostras positivas para a enzima *Hinf I*, compatível com o  
diagnóstico de *Babesia cani rossi*. Gel de agarose a 2% (p/v) corado  
com brometo de etídeo a 0,01% (p/v)

- FIGURA 9** Resultado da PCR para o gênero *Babesia* spp., *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* utilizando-se os oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R, BCV-F e 793-772-R, BCR-F e793-772-R, respectivamente. Legenda: 1: controle negativo (água); 2: Amostra positiva para *Babesia* spp.; 3: amostra positiva para *B. canis vogeli*; 4: amostra positiva para *B. canis rossi*; 5: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); Gel de agarose a 2% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) 36
- FIGURA 10** Resultado da PCR para o gene da enzima GAPDH, utilizando os primers GAPDH-F e GAPDH-R. Legenda: 1: controle positivo; 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos; 8:Ladder 100pb (Invitrogen®). Gel de agarose a 1,5%(p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v) 36

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

<b>A/G</b>	Albumina/Globulina
<b>ALT</b>	Alanino aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>°C</b>	Graus Celcius
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpusculas média
<b>DNA</b>	Ácido desoxirrinonucléico
<b>dNTP</b>	Trifosfatos de desoxirribonucleosídeos
<b>Dr.</b>	Doutor
<b>Dra.</b>	Doutora
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>FA</b>	Fosfatase Alcalina
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>g/dL</b>	Gramas por decilitro
<b>HCL</b>	Ácido Clorídrico
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>M</b>	Molar
<b>µL</b>	Microlitros
<b>PPT</b>	Proteína plasmática total
<b>PT</b>	Proteína sérica
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucléico ribossômico
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>VG</b>	Volume globular

## PREFÁCIO

O trabalho foi realizado com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a ocorrência da infecção por *Babesia* spp. e suas alterações laboratoriais em cães da região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste). Essa doença é transmitida pela picada do carrapato e acomete cães de todo o mundo ocasionando principalmente febre, anorexia e icterícia.

O capítulo I mostra uma breve revisão do conhecimento atual sobre a doença e seus principais agentes. Procura explorar a descoberta de novas espécies envolvidas na afecção, com importante ênfase no diagnóstico.

O capítulo II tem por objetivo relatar o experimento realizado, os resultados encontrados, bem como a relevância do estudo para o conhecimento da doença, dos diferentes agentes e das técnicas diagnósticas atuais.

O capítulo III levanta a relevância do presente trabalho e perspectivas futuras.

## RESUMO

A babesiose canina é uma doença endêmica no Brasil, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O presente trabalho teve por objetivos determinar a ocorrência da infecção por *Babesia* spp., identificar as sub-espécies infectantes, caracterizar as principais alterações hematológicas e bioquímicas, assim como verificar a frequência de co-infecções com outros hemoparasitas em cães da região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste), Distrito Federal. Foram utilizadas 187 amostras sanguíneas de cães sendo 124 pertencentes a região da Fercal e 63 de um abrigo de cães no Lago Oeste. Os animais foram divididos em três grupos: G1 (cães infectados apenas por *Babesia* spp.), G2 (cães infectados por *Babesia* spp. e com co-infecções por *Hepatozoon* sp., *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp.) e G3 (cães negativos para *Babesia* spp.). A ocorrência observada de infecção por *Babesia* spp. foi 22,99%. Foram identificadas *B. canis vogeli* e *B. canis Rossi* como as duas sub-espécies que acometem cães desta região, sendo que esta última, até o presente momento não haviam relatos no Brasil. As principais alterações hematológicas e bioquímicas nos cães infectados foram: anemia (65,78%), monocitose (89,47%), trombocitopenia (60,52%), hiperproteinemia (68,42%), hipoalbuminemia (60,52%) e diminuição da relação albumina/globulina. O presente estudo permitiu concluir que a babesiose canina é endêmica nas regiões periurbanas de Brasília, duas sub-espécies (*B. canis vogeli* e *B. canis rossi*) infectam os cães desta região e a infecção por *B. canis rossi* está presente na região de Brasília.

1. *Babesia* spp. 2. Cães. 3. Hematologia 4. Bioquímica 5.PCR. 6.Sub-espécies.

## ABSTRACT

Canine babesiosis is endemic in Brazil, and transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. This study aims to determine the occurrence of infection by *Babesia* spp., identify the infective sub-species, characterize the main hematological and biochemical changes, and determine the frequency of co-infections with other hemoparasites in the peri-urban region of Brasília ( Fercal and Lago Oeste), Distrito Federal. We used 187 blood samples from dogs, being 124 from Fercal and 63 from a rescue shelter in Lago Oeste. The animals were divided into three groups: G1 (dogs only infected by *Babesia* spp.), G2 (dogs infected with *Babesia* spp. and co-infections with *Hepatozoon* sp., *Ehrlichia* sp. and *Leishmania* sp.) and G3 (dogs negatives for *Babesia* spp.). The occurrence of *Babesia* spp. infection was found 22.99%. *B. canis vogeli* and *B. canis rossi* were identified as the causative agents of babesiosis in this regions, the latter until now had not been reported in Brazil. We observed the following hematological and biochemical changes in infected dogs anemia (65.78%), monocytosis (89.47%), thrombocytopenia (60.52%), hyperprotein (68.42%), hypoalbumin (60.52%) and decreased albumin / globulin. This study concluded that canine babesiosis is endemic in peri-urban areas of Brasilia, two sub-species (*B. canis vogeli* e *B. canis rossi*) infect dogs in this region, and infection with *B. canis rossi* is present in the region of Brasilia.

1. *Babesia* spp.
2. Dogs.
3. Hematology.
4. Biochemistry
5. PCR.
6. Sub-species



## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

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

A babesiose canina é endêmica no Brasil, causada pela *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, ambas transmitidas principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres e Figueredo, 2006). Casos de babesiose canina têm sido reportados em vários estados do Brasil, ocasionando diversos sinais clínicos como desidratação, febre, apatia, anorexia, esplenomegalia, linfadenomegalia e icterícia (Furlanello et al., 2005).

Historicamente, a infecção por *Babesia* vem sendo identificada por meio da microscopia óptica que possibilita a visualização do piroplasma no interior do eritrócito no esfregaço sanguíneo (Boozer e Macintire, 2003). A distinção entre as duas espécies de *Babesia*, nos cães, era baseada na especificidade do hospedeiro e na morfologia das formas intraeritrocitárias, já que apresentam uma considerável diferença de tamanho. Dessa forma, grandes *Babesias* (4-5 $\mu$ m) eram consideradas como *Babesia canis* e pequenas *Babesias* (1-2,5 $\mu$ m), como *Babesia gibsoni*. Esse critério de caracterização era fundamentado na hipótese que nenhuma outra espécie de *Babesia* infectava os cães (Hauschild et al., 1995; Cacciò et al., 2002).

Nos últimos anos, com o advento da biologia molecular, foi questionada a caracterização dos isolados de *Babesia canis* oriundos de diferentes regiões geográficas. O diagnóstico molecular da *Babesia* spp. tem demonstrado que a especificidade de piroplasmídeos pelos hospedeiros é menor do que se supunha

anteriormente e somente o uso de técnicas sensíveis de diagnóstico poderiam caracterizar com precisão as espécies (Jefferies et al., 2003).

Diante do exposto, o estudo da infecção por *Babesia* em cães de áreas periurbanas de Brasília se faz necessário para verificarmos a frequência e importância da infecção nesses animais e assegurar se realmente existe apenas uma única espécie de *Babesia* parasitando os cães, já que a diferenciação específica de *Babesia* não tem apenas interesse acadêmico, mas também, em relação a sintomatologia, prognóstico, tratamento e vacinação.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Taxonomia

A babesiose canina é uma doença causada pelo protozoário intraeritrocitário *Babesia* sp., classificado no Filo *Apicomplexa*, Classe *Sporozoa*, Subclasse *Coccidiasina*, Ordem *Piroplasmorida*, Família *Babesiidae* e Gênero *Babesia* (O'Dwyer & Massard, 2002; Vial & Gorenflot, 2006). O Filo *Apicomplexa*, caracteriza-se pela presença de um complexo apical e citoesqueleto único e distinto de outros eucariotas (Gordon e Sibley, 2005).

Desde a primeira descrição em 1910, todos os cães infectados por pequenas *Babesias* eram considerados como infectados por *Babesia gibsoni*. Zahler et al. (2000), descreveram uma pequena *Babesia* isolada em cães na Alemanha que são genotipicamente distintas da *B. gibsoni* isolada nos cães da Califórnia, este parasita foi relatado como a *Babesia microti*.

Atualmente são reconhecidas três sub-espécies de *Babesia canis*: *Babesia canis canis*, transmitida por *Dermacentor reticulatus*; *Babesia canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* e *Babesia canis rossi* (Carret et al., 1999).

Novas espécies de *Babesia* estão sendo isoladas de hospedeiros vertebrados. Entre as *Babesias* recentemente descobertas estão incluídas: *B. venatorum* sp., *Babesia* sp. EU1, *Babesia* sp. MO-1 e *B. china* BQ1, consideradas zoonoses (Guan et

al., 2002; Liu et al., 2007). Além dessas espécies, muitas outras já foram descritas há muito tempo, mas informações biológicas, nomenclaturas, identificação dos vetores e dados moleculares ainda são escassos (Uilenberg, 2006).

### **Etiologia**

Tradicionalmente, a identificação das espécies tem sido baseada na especificidade do hospedeiro e morfologia do piroplasma intraeritrocítico. Baseado nisso, piroplasmas caninos têm sido organizados como duas espécies distintas: as grandes *Babesias* (4-5µm) – *Babesia canis* e as pequenas *Babesias* (1-2,5µm) – *Babesia gibsoni* (Hauschild et al., 1995).

A *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são consideradas as duas espécies que causam a babesiose canina, doença hemolítica de relevância na clínica de cães (Lobetti, 1998).

A *Babesia canis* é uma grande *Babesia*, cujas formas piriformes variam de 2,61 a 5,22 µm de comprimento. Além das formas piriformes, predominam parasitos redondos, ovais, alongados ou amebóides. Hemácias podem ser parasitadas com quatro, oito ou mais trofozoítos. Também é freqüente o encontro de formas livres no plasma, bem como hemácias fagocitadas no interior de monócitos (O'Dwyer et al., 1997). Análises moleculares têm demonstrado três sub-espécies distintas de *Babesia canis*: *B. canis rossii*, *B. canis canis* e *B. canis vogeli*. As três sub-espécies são morfologicamente indistintas e demonstram enorme variação nos sinais clínicos, distribuição geográfica e especificidade do vetor (Cacciò et al., 2002).

Por outro lado, a *Babesia gibsoni* é um pequeno hemoprotozoário que causa anemia hemolítica em cães. Os parasitas são pleomórficos, possuem 1 a 2,5µm de diâmetro e comumente aparecem como uma forma simples nas hemácias (Macintire et al., 2002).

### **Distribuição geográfica**

A babesiose foi descrita pela primeira vez em 1888, na Romênia, quando Victor Babés observou um parasita em hemácias de sangue bovino (Barreira et al., 2005).

Mas a primeira observação da babesiose canina causada por *B. canis* deve-se, em 1895, a Piana e Galli-Valerio, na Itália (O'Dwyer et al., 1997).

*Babesia gibsoni* foi descrita pela primeira vez na Índia, por Patton (1910), parasitando cães (Zahler et al., 2000). A *B. gibsoni* tem sido encontrada na Ásia, América do Norte, norte e leste da África (Kjemtrup et al., 2006), Europa (Casapulla et al., 1998) e, recentemente, no Brasil (Trapp et al., 2006).

A *B. canis* está distribuída mundialmente, sendo descrita na África, Américas, Ásia e Europa (Abdullahi et al., 1990).

As sub-espécies de *B. canis* ocorrem em diferentes regiões: *B. canis. rossi* é encontrada no sul da África (Uilenberg et al., 1989) e no Sudão (Oyamada et al., 2005); *B. canis. canis* é encontrada na Europa (Uilenberg et al., 1989; Cacciò et al., 2002; Criado-Fornelio et al., 2003; Foldvari et al., 2005) e *B. canis vogeli*, no norte e sul da África (Matijila et al., 2004), na América do Norte (Uilenberg et al., 1989), na Europa (Cacciò et al., 2002; Criado-Fornelio et al., 2003), na Austrália (Jefferies et al., 2003), no Sudão (Oyamada et al., 2005), na Turquia (Gülanber et al., 2006) e no Brasil (Passos et al., 2005, Duarte et al., 2008).

A babesiose canina tem sido descrita no Brasil desde o início do século XX (Regendanz e Muniz, 1936). Casos de babesiose canina tem sido reportadas em muitos estados do Brasil, como o Rio Grande do Sul (Braccini et al., 1992), São Paulo (Dell'Porto et al., 1993), Pernambuco (Dantas-Torres et al., 2006), Rio de Janeiro (Guimarães et al., 2004), Minas Gerais (Bastos et al., 2004), Paraná (Trapp et al., 2006), Bahia (Ungar de Sá et al., 2007), Goiás (Duarte et al., 2008) e Distrito Federal (Vasconcelos et al., 2008).

A incidência da doença parece ser maior entre os cães adultos, embora cães jovens com histórico recente de visitas a praia e primeira exposição aos carrapatos também são altamente suscetíveis à infecção (Guimarães et al., 2004; Trapp et al., 2006). De acordo com os casos descritos, aparentemente não há predileções quanto a raça e sexo (Bastos et al., 2004).

## **Transmissão**

No Brasil, o agente etiológico da babesiose canina é a *B. canis*, transmitida pela picada do *Rhipicephalus sanguineus*, também conhecido como carrapato marrom do cão (Labruna e Pereira, 2001). O *Rhipicephalus sanguineus* é a principal espécie envolvida na transmissão da *B. canis vogeli* para o cão; enquanto que a *Babesia canis canis* tem como vetor o carrapato *Dermacentor reticulatus* e *B. canis rossi* é transmitida pelo carrapato *Haemophysalis leach* (Uilenberg et al., 1989). A transmissão pode ocorrer de duas formas: transmissão transtadial ou horizontal e a transmissão transovariana ou vertical. Na transmissão transtadial ou horizontal os carrapatos adquirem *Babesia* como larva ou ninfa e a transmitem no estágio seguinte. A transmissão transovariana ocorre quando a fêmea infectada transmite o parasito para seus descendentes, com as larvas já eclodindo infectadas. Todos os estágios podem transmitir *B. canis*, sendo as ninfas e os adultos mais eficientes na transmissão (O'Dwyer & Massard, 2002; Trapp et al., 2006).

Uma característica comum de transmissão dos parasitas apicomplexas é a existência de estágios específicos envolvidos na sua transmissão entre hospedeiros vertebrados e vetores. Estes estágios de transmissão são pouco conhecidos (Chauvin et al., 2009).

### **Ciclo Biológico**

Os hospedeiros vertebrados são infectados por meio da picada do carrapato que introduz a saliva contendo esporozoítos. Os esporozoítos penetram diretamente as células vermelhas do sangue onde desenvolvem as fases parasitárias. No interior do eritrócito, o parasita produz dois merozoítos por fissão binária e após a lise deste, cada merozoíto infecta outro eritrócito, ocorrendo numerosas divisões e novas infecções. A multiplicação ocorre de forma assíncrona e vários estágios divisionários do parasita podem ser visualizados na corrente sanguínea ao mesmo tempo. O tamanho e a localização dos merozoítos dependem tanto da *Babesia* quanto da espécie hospedeira (Adachi et al., 1993; Chauvin et al., 2009).

Os carrapatos se contaminam por ingestão do sangue infectado do hospedeiro vertebrado. Nas células intestinais do carrapato, ocorre a reprodução assexuada,

denominada esporogonia, que origina os esporocinetos. Estes invadem a hemolinfa do artrópode e migram para outros órgãos do carrapato, incluindo glândula salivar e ovários, infectando-os. Na glândula salivar, os esporocinetos originam os esporozoítas infectantes. Os esporocinetos, presentes nos ovários da fêmea, atingirão os ovos, infectando as larvas que nascem contaminadas (Ewing, 1965; O'Dwyer et al., 1997; O'Dwyer e Massard, 2002; Vidotto & Trapp, 2004).

É importante salientar que, quando os eritrócitos infectados por *Babesia* são ingeridos pelos carrapatos, a maioria dos parasitas são destruídos. No entanto, algumas fases específicas do parasita sobrevivem e originam gametócitos. Poucas horas depois da ingestão os organismos começam a ser visualizados na corrente sanguínea pela microscopia (Mehlhorn e Schein, 1984).

### **Patogenia**

A patogenia da babesiose está relacionada com a ação hemolítica intra e extravascular, podendo variar de acordo com a espécie ou sub-espécie envolvida na infecção, imunidade e idade do hospedeiro (O'Dwyer & Massard, 2002; Boozer & Macintire, 2003).

A resposta imunológica desempenha o papel mais importante da patogenia da babesiose canina. A *Babesia* inicia um mecanismo de destruição citotóxica de eritrócitos circulantes mediada por anticorpos (Pedersen, 1999; Irwin, 2005). Isso faz com que ocorra a hemólise intravascular e extravascular que leva a anemia e hemoglobinemia. Eritrócitos com anticorpos são destruídos pelos macrófagos do baço e do fígado (hemólise extravascular). A hemólise intravascular é resultado da reação do complemento antígeno-anticorpo de superfície (Day, 1999).

### **Sinais clínicos**

Os sinais clínicos da babesiose canina podem variar de acordo com a espécie de *Babesia* envolvida, a imunidade do hospedeiro, idade, doenças concomitantes e localização geográfica (refletindo a distribuição de diferentes espécies de *Babesia* e/ou

sorotipos). A babesiose canina pode ser classificada clinicamente como leve ou severa, ou pode ser classificada como hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica. Na babesiose leve, os sinais clínicos são anemia hemolítica, febre, taquipnéia, taquicardia, esplenomegalia, icterícia e depressão. A babesiose severa é caracterizada por insuficiência renal, hepatopatia, desconforto respiratório, lesões no miocárdio e sistema nervoso central (que podem estar relacionados com a babesiose cerebral e sinais neurológicos derivados da hipoglicemia) (Lobetti et al., 2002).

A identificação das espécies e sub-espécies de *Babesia* é importante para determinar a virulência, prognóstico e resposta a drogas anti-babesia, pois cada organismo responde de forma diferente de acordo com a sub-espécie envolvida na infecção (Kocan et al., 2001).

Existe similaridade morfológica entre as sub-espécies de *Babesia canis*. Estudos revelaram, no entanto, uma patogenicidade maior para *Babesia canis rossi* em relação a *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli*, com quadros geralmente fatais (Schetters et al., 1997). Comumente há quadros de anemia hemolítica, febre e letargia, anorexia, hematúria e esplenomegalia, sendo a patogenia relacionada principalmente à multiplicação destes parasitos nas hemácias dos hospedeiros (Murase et al., 1993).

A infecção por *Babesia canis rossi* é descrita como a mais virulenta das sub-espécies causando anemia hemolítica ou até uma resposta inflamatória aguda (Reyers et al., 1998). Por outro lado, a infecção por *Babesia canis canis* é capaz de causar uma gama de sinais clínicos como letargia, anorexia, febre, icterícia, anemia e trombocitopenia (Boozer & Macintire, 2003). A *Babesia canis vogeli* ocasiona uma doença relativamente suave, muitas vezes sem evidência de sinais clínicos (Cacciò et al., 2002). Desta maneira, apenas as técnicas de biologia molecular podem distinguir estas sub-espécies morfológicamente similares (Bourdoiseau, 2006).

## **Patologia Clínica**

### **Alterações hematológicas**

Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil tem demonstrado grande diversidade de alterações hematológicas decorrentes da babesiose canina. Dentre as alterações, podem-se verificar com maior frequência anemia normocítica normocrômica, policromasia, anisocitose, leucocitose por neutrofilia, monocitose, linfopenia e trombocitopenia (Schetters et al., 1997; Guimarães et al., 2004; Furlanello et al., 2005).

A anemia inicialmente é leve, normocítica normocrômica e pode ser observada na fase aguda da doença, quando os piroplasmas são mais facilmente visualizados no esfregaço sanguíneo ou na borda de orelha, porém ainda sem tempo de resposta medular levando a característica arregenerativa e momentânea da anemia (Vasconcelos et al., 2008) e com a progressão da doença, torna-se então macrocítica hipocrômica e regenerativa (Furlanello et al., 2005). Estas variações podem ser decorrentes do estágio da doença, da espécie e sub-espécie de *Babesia* que acomete cada animal (Thrall et al., 2007; Zygnier et al., 2007).

Alterações leucocitárias são observadas de formas variadas, mas incluem leucopenia, leucocitose, neutrofilia ou neutropenia, linfocitose e eosinofilia (Vercammen et al., 1997). Estudos realizados por Zygnier et al. (2007) indicam que há o aumento do número de bastonetes, comumente observado em infecções agudas e pode ser causado por doença imunomediada. Ainda foi relatado aumento do número total de monócitos por Guimarães et al. (2004).

Em estudo recente foi verificado que a trombocitopenia moderada e severa é comum na babesiose canina independente da sub-espécie envolvida (Lobetti et al., 2002). A trombocitopenia tem sido atribuída mais comumente à ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) que pode ter como causas predisponentes hemólise, vasculite, acidose, hipóxia, dentre outros, sendo estas alterações clínicas comuns na babesiose (Campos et al., 2002).

### **Alterações bioquímicas**

As alterações bioquímicas causadas pela infecção por *B. canis* estão relacionadas à gravidade da doença e ao grau de hipóxia. Achados comuns são aumento da atividade sérica da aspartato amino-transferase (AST) e alanina



aminotransferase (ALT), hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, anormalidades eletrolíticas e distúrbios ácido-base (hipocalcemia, hiperclóremia e acidose metabólica) (Pagès et al., 1990; Bourdeau e Guelfi, 1995; Vercammen et al., 1997; Lobetti, 2000).

*Babesia canis* causa doença caracterizada em sua forma aguda por anemia hemolítica regenerativa, febre e hemoglobinúria, havendo, na forma severa da enfermidade, queda nos níveis séricos de proteínas e albumina (Furlanello et al. 2005). Há relatos de aumento dos níveis séricos de uréia, creatinina, elevação da atividade de AST (Scally et al. 2006), aumento da atividade de ALT e FA, hipergamaglobulinemia moderada. Contudo, na forma branda da doença os valores séricos são encontrados dentro da normalidade (Irizarry- Rovira et al. 2001).

## **Diagnóstico**

Apesar dos estudos realizados, pouco se sabe sobre a epidemiologia da doença em cães residentes no país. Além disso, à alta morbidade, causada pela babesiose, vem trazendo grande preocupação aos criadores de cães, tanto pelo aspecto afetivo, quanto pelo impacto negativo na comercialização dos animais (Ungar de Sá et al., 2007).

As formas de diagnóstico da babesiose canina incluem os achados clínicos, diagnóstico parasitológico, testes sorológicos e moleculares (O'Dwyer & Massard, 2002).

O diagnóstico definitivo da babesiose canina, bem como a diferenciação das espécies de piroplasmas pode ser difícil para os clínicos. Historicamente, o exame microscópico em esfregaço sanguíneo e a sorologia tornaram-se o principal meio de diagnóstico da babesiose em cães.

O exame microscópico direto do esfregaço sanguíneo é o método convencionalmente empregado para o diagnóstico diferencial entre *B. canis* e *B. gibsoni*, tendo como base as características morfométricas de referência para cada espécie (Kjemtrup et al., 2006). Usualmente, o diagnóstico é feito de acordo com a aparência morfológica e o tamanho das formas intra eritrocitárias no esfregaço de

sangue periférico. Entretanto, as parasitemias são normalmente muito baixas ou os parasitas não são detectados nos esfregaços sanguíneos, então o sorodiagnóstico é uma opção muito boa para estudos epidemiológicos. Contudo, há relatos de cães infectados por *Babesia* sp. em que os piroplasmas não foram visualizados ao exame microscópico e/ou em que a sorologia obteve resultado falso-negativo (Birkenheuer et al., 1999; Macintire et al., 2002).

A sorologia e o exame microscópico em esfregaço sanguíneo além de resultarem muitas vezes em diagnósticos falso-negativos, não permitem a diferenciação entre sub-espécies, para isso tem sido aplicada a metodologia com base em biologia molecular (Carret et al., 1999; Duarte et al., 2008).

Métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apresenta maior sensibilidade e especificidade que a pesquisa em esfregaço sanguíneo para detectar a infecção por *Babesia* sp. no sangue periférico e pode diferenciar espécies morfológicamente que não são diferenciadas pelo método do esfregaço sanguíneo (Criado-Fornelio et al., 2003).

A combinação da análise da sequência gênica à PCR pode aumentar as informações sobre sub-espécies, apresentando uma vantagem em estudos epidemiológicos com métodos moleculares (Inokuma et al., 2004).

## **Tratamento**

O tratamento tem sido feito principalmente com derivados de diamidinas e imidocarb. Cães de áreas onde ocorrem a *Babesia canis* ou que viajam para áreas endêmicas podem ser tratados profilaticamente com imidocarb e doxiciclina (Urquhart et al, 1998).

O imidocarb, por sua vez, é uma carbanilida, cuja ação baseia-se na alteração morfológica e funcional do núcleo e do citoplasma do parasito. Seu emprego no tratamento desta enfermidade é recomendado por alguns autores e desaconselhado por outros. Quando utilizado por longos períodos, os resíduos metabólicos deste fármaco são depositados no fígado e rim (Andrade & Santarém, 2002).

O prognóstico é bom, porém muitos animais tratados permanecem como portadores da doença, podendo dessa forma ocorrer recidivas (Jones et al., 2000).

O modo principal de prevenção é o controle do carrapato vetor, visto haver necessidade de pelo menos 3 dias para que ocorra a transmissão do parasita (Ettinger & Feldman, 1995).

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Verificar a ocorrência da infecção por *Babesia* sp. na região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste), Distrito Federal.
- Identificar as sub-espécies de *Babesia* sp. que acometem os cães em região periurbana de Brasília.
- Caracterizar as principais alterações hematológicas e bioquímicas da infecção por *Babesia* sp.
- Verificar a ocorrência de co-infecção de *Babesia* sp., com outros hemoparasitas como: *Hepatozoon* sp., *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp..

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, S.U.; MOHAMMED, A.A.; TRIMNELL, A.S.; ALAFIATAYO, R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**. v.31, p.145-147, 1990.
- ADACHI, K.; UENO, C.; MAKIMURA, S. Immunosuppression in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. **J. Vet. Med. Sci.** v.55, p.503–505, 1993.
- ANDRADE, S.F.; SANTARÉM, V.A. Endoparasitocidas e ectoparasitocidas. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2ª Ed.: Roca, São Paulo, cap. 18, p.437-476, 2002.
- BARREIRA, J.D. et al. Dinâmica de infecção de *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Ciência Rural**. v.35, n.5, p. 1131-1135, 2005.
- BASTOS, C.V.; MOREIRA, S.M.; PASSOS, L.M. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis im Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1026, p.158-160, 2004.
- BIRKENHEUER, A.J., LEVY, M.G., SAVARY, K.C., GAGER, R.B., BREITSCHWERDT, E.B. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v.35, p.125-128, 1999.
- BOOZER, A.L. & MACINTIRE, D.K. Canine Babesiosis. **Vet. Clin North Am. Small Anim. Pract.** v.33, p.885-904, 2003.
- BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babésiose canine à *Babesia canis*. **Point Vét.** v.27, p.11-24, 1995.
- BOURDOISEAU, G. Canine babesiosis in France. **Veterinary Parasitology**. v.138, p.118-125, 2006.
- BRACCINI, G.L.; CHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos de 1986-1990. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.20, p.134-149, 1992.

- CACCIÒ, S.M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R.R.; SLEMENDA, S.B.; PIENIAZEK, N.J. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 285-92, 2002.
- CAMPOS, K. C. H.; MACHADO, L. P.; SANTOS, K. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S.; SILVEIRA, V. F.; MATTOSO, C. R. S.. Incidência de trombocitopenia em cães naturalmente infectados por *Babesia canis*. In: 6ª Mostra científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, 2002, Botucatu. **Anais 6ª Mostra científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP**. Botucatu : FMVZ-UNESP/Botucatu. p. 56, 2002.
- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 46, p. 298-303, 1999.
- CASAPULLA, R.L.; BALDI, V.; AVALLONE, R.; SANNINO, L.; PAZZANESE, L.; MIZZONI, V. Canine piroplasmiasis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. **Vet. Rec.** v.142, p. 168-169, 1998.
- CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its host: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Vet. Res.** 40:37, 2009.
- CRIADO-FORNELIO A.; GONZALEZ-DEL-RIO, M.A.; BULLING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular characterization of *Babesia gibsoni* isolate from Spanish dog. **Vet. Parasitol.** v.117, p.123-129, 2003.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology.** v.141, p.197-203, 2006.
- DAY, M.J. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anemia. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.69, p.215-224, 1999.
- 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.
- DUARTE, S.C.; LINHARES, G.F.C.; ROMANOWSKI, T.N.; NETO, O.J.S.; BORGES, L.M.F. 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.** v.152, p.16-20, 2008.
- ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** São Paulo: Editora Manole, p.563-564, 1995.
- EWING, S.A. Methods of reproduction of *Babesia canis* in erythrocytes. **American Journal of Veterinary Research.** v.26, n.112, p. 727-733, 1965.
- FOLDVARI, G.; HELL, E.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Vet Parasitol.** v.127, p. 221-226, 2005.
- FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALEGO, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitology.** v.134, p. 77-85, 2005.
- GORDON J.L.; SIBLEY L.D., Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. **BMC Genomics.** 6:179, 2005.
- GUAN G.Q.; YIN H.; LUO J.X.; LU W.S.; ZHANG Q.C.; GAO Y.L.; LU B.Y.. Transmission of *Babesia* sp. to sheep with field-collected *Haemaphysalis qinghaiensis*. **Parasitol. Res.** 88:S22–S24, 2002.
- 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 (suppl. 1), p.229, 2004.
- GÜLANBER, A.; GORENFLOT, A.; SCHETTERS, T.P.M.; CARCY, B. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. **Vet Parasitol.** v.139, p.224-230, 2006.

- HAUSCHILD, S.; SHAYAN, P.; SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitol. Res.** v.81, p.638-642, 1995.
- INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K. et al. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Vet. Parasitol.** v.121, p.341-346, 2004.
- IRWIN, P.J. Babesiosis and cytauxzoonosis. In Shaw, S.E., Day, M.J. (Eds), Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. **Manson Publishing**, Barcelona, p. 63-77, 2005.
- IRIZARRY-ROVIRA, A.R.; STEPHENS, J.; CHRISTIAN, J.; KJEMTRUP, A.; DENICOLA, D.B.; WIDMER, W.R.; CONRAD, P.A. *Babesia gibsoni* Infection in a Dog from Indiana. **Veterinary Clinical Pathology.** V.30, n.4, p.180-188, 2001.
- JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; MUHINICKEL, C.J.; IRWIN, P.J. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 409-12, 2003.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária.** 6ª Ed. São Paulo: Editora Manole, p.605-607, 2000.
- KJEMTRUP, A.M.; WAINWRIGHT, K; MILLER, M.; PENZHORN, B.L.; CARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. Nov., small canine *Babesia* identified in California: *Babesia conradae* on the literature. **Veterinary Parasitology.** v.138, p. 103-111, 2006.
- KOCAN, A.A.; KJEMTRUP, A.; MEINKOTH, J.; WHITWORTH, L.C.; MURPHY, G.L.; DECKER, L.; LORENZ, M. A genotypically unique *Babesia gibsoni*-like parasite recovered from a dog in Oklahoma. **J. Parasitol.** 87:437-438, 2001.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, ano 6, n.30, p. 24-32, 2001.
- LOBETI, R.G. Canine Babesiosis. **Compendium.**, v.20, p.418-31, 1998.
- LOBETI, R.G. Canine Babesiosis. In: Day, M.J., Mackin, A., Littlewood, J.D. (Eds.), **BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.** **BSAVA, Gloucester**, p. 85-91, 2000.



- LOBETTI, R.G.; DIVER, E.; PEARSON, J. Cardiac troponins in canine babesiosis. **Journal of veterinary Internal Medicine.** v.16, p.63-68, 2002.
- LIU, A.H.; YIN, H.; GUAN, G.Q.; SCHNITTGER, L.; LIU, Z.J.; MA, M.L. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China, **Vet. Parasitol.** 147:246–251, 2007.
- MACINTIRE, D.K.; BOUDREAUX, M.K.; WEST, G.D.; BOURNE, C.; WRIGHT, J.C.; CONRAD, P.A. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.220, p.325-329, 2002.
- MATJILA, P.T.; PENZHORN, B.L.; BEKKER, C.P.J.; NIJHOF, A.M.; JONGEJAN, F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Vet Parasitol.** v.122, p. 119-125, 2004.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages, **Adv. Parasitol.** v.23, p. 37-103, 1984.
- MURASE, T.; IWAI, M.; MAEDE, Y. Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. **Parasitology Research**, v. 4, n. 79, p. 269-71, 1993.
- O'DWYER, L.H.O.; MASSARD, C.L.; DAEMON, F. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) no intestino e hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latrelli, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.6, n.1, p.11-14, 1997.
- O'DWYER, L.H.O. & MASSARD, C.L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses, p.57-67. In: Almosny N.R.P. (Org.). **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses.** L.F. Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, 135p., 2002.
- OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossii*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Cl. Diag. Lab. Immunol.** v.12, p. 1343-1346, 2005.

- PAGÈS, J.P.; VIDOR, E.; TROUILLET, J.L.; BISSUEL, G.; LECOINTRE, O.; MOREAU, Y. Description clinique, hématologique et sérologique de 133 cas de babésiose canine. **Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.** v.25, p.89-97, 1990.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLERRINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 81-5, 2005.
- PEDERSEN, N.C. A review of immunologic diseases of the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.69, p.251-342, 1999.
- REGENDANZ, P.; MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissora de piroplasmose canina no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.31, p. 81-84, 1936.
- REYERS, F.; LEISEWITZ, A.L.; LOBETTI, R.G.; MILNER, R.J.; JACOBSON, L.S.; VAN ZYL, M. Canine babesiosis in South Africa: more than one disease Does this serve as a model for falciparum malaria? **Ann. Trop. Med. Parasitol.** V. 92, p.503-511, 1998.
- RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Florida: CRC Press Inc., 255p., 1988.
- SCHETTERS, T.P.M.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E.; KLEUSKENS, J.; SCHOLTES, N.C.; GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology.** v.115, p. 485-493, 1997.
- SCALLY M.P.; LEISEWITZ A.L.; LOBETTI R.G.; THOMPSON P.N. The elevated serum urea:creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. **J. S. Afr. Vet. Assoc.** v.77, n.4, p. 175-178, 2006.
- THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed. Roca: São Paulo, p. 335-354, 2007.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.** v.140, p.223-230, 2006.
- UILENBERG, G. *Babesia* - a historical overview, **Vet. Parasitol.** 138:3–10, 2006.

- UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.; PERIE, N.M.; SPANJER, A.A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **The Veterinary Quarterly**. v.11, n.1, p. 33-40, 1989.
- UNGAR DE SÁ, M.F.M.; UNGAR DE SÁ, J.E.; BITTENCOURT, D.V.V.; BISPO, A.C.; RÉGIS, A.M.M.; SOUZA FILHO, N.J.; GOMES NETO, C.M.B.; SOUZA, B.M.P.S.; BITTENCOURT, T.C.C.; FRANKE, C.R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. **Rev. Bras. Saúde e Prod. Animal**. V.8, n.3., p.178-183, jul/set, 2007.
- URQUHART, et al. **Parasitologia Veterinária**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 214, 1998.
- VASCONCELOS, M. F.; PALUDO, G. R.; BITTENCOURT, R. F.; MARÇOLA, T. G.; FIRMINO, F. DE P.; CHIARELI, R. A. Frequência de hemoparasitoses em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, Brasil. In: **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, 2008.
- 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.
- VIAL, H.J. & GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*. v.138, p.147-160, 2006.
- VIDOTTO, O. & TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, suplemento 1, p. 58-62, 2004.
- ZÄHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dog. **Veterinary Parasitology**, v.89, p.241-248, 2000.
- ZYGNER, W.; RAPACKA, G.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; DLUGOSZ, E.; WEDRYCHOWICZ, H. Biochemical abnormalities in serum of dogs infected with large *Babesia* in Warsaw (Poland). **Polish Journal of Veterinary Science**. v.10, n.4, p. 245-253, 2007.

## CAPÍTULO II

### ESTUDO DA INFECÇÃO POR *BABESIA* SPP. EM CÃES DA ÁREA PERIURBANA DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL

#### INTRODUÇÃO

A babesiose é uma hemoparasitose de distribuição mundial que acomete muitas espécies de mamíferos e é causada pela multiplicação intraeritrocitária de apicomplexas do gênero *Babesia*. O sucesso da evolução deste parasita é atestado pelo grande número de espécies descritas (mais de 100 espécies, com algumas que ainda não foram descobertas e/ou descritas) (Hunfeld et al., 2008).

O agente da doença é um protozoário da ordem Piroplasmidae, gênero *Babesia* e no cão são conhecidas duas espécies *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* (Farwell et al., 1982; Ristic, 1988).

O diagnóstico da babesiose canina é usualmente baseado na presença de sinais clínicos tais como: apatia, febre, anorexia, perda de peso, palidez das mucosas; e histórico do paciente. A infecção por *Babesia* sp. é confirmada pela visualização do piroplasma no esfregaço sanguíneo (Dantas-Torres, 2008).

O uso do diagnóstico molecular, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), aliado ao seqüenciamento genético, tem revelado grande diversidade genética dos piroplasmídeos (Criado-Fornelio et al., 2003). A PCR através da caracterização dos genes da unidade 18S do DNA, é capaz de identificar diferentes espécies e sub-espécies de *Babesia* spp. antes indistinguíveis, devido a similaridade

morfológica dos parasitas (Birkenheuer et al., 2004; Duh et al., 2004; Matjila et al., 2004; Sá et al., 2006).

Estudos moleculares realizados no Brasil apontam *Babesia canis vogeli* (Passos et al., 2005; Sá et al., 2006) e *Babesia gibsoni* (Trapp et al., 2006) como sendo as espécies envolvidas na infecção da babesiose canina. São escassos os estudos relacionados à caracterização molecular destes piroplasmídeos nas diferentes regiões do Brasil.

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a frequência de infecção por *Babesia* sp., as alterações hematológicas e bioquímicas de cães naturalmente infectados da região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste); Identificar as sub-espécies de *Babesia* sp. que acometem os cães nesta região, assim como verificar a ocorrência de co-infecção de *Babesia* sp. com outros hemoparasitas como: *Hepatozoon* sp., *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram colhidas 187 amostras de sangue de cães oriundos da região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste), Distrito Federal. Foram incluídos nessa amostragem cães domésticos pertencentes a um grupo de risco para infecção por babesiose canina, ou seja, animais de qualquer idade, raça ou sexo, apresentando ou não sintomatologia de babesiose canina, e com presença de ectoparasitas. Dos animais analisados, 124 cães eram residentes de domicílios na Fercal (Sobradinho II) e 63 cães pertenciam a um abrigo de cães, localizado no Lago Oeste.

Todos os animais foram submetidos a exame físico para análise de coloração de mucosa oral, conjuntiva ocular e estado geral.

### **Colheita de sangue e Análise Hematológica**

Foram colhidas amostras sanguíneas de todos os animais por punção da veia cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para realização do hemograma completo e testes bioquímicos para avaliar o perfil renal e hepático desses animais. Neste momento foram também preparados esfregaços sanguíneos da borda de orelha, que posteriormente foram corados com panótico rápido (Interlab<sup>®</sup>).

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (Hospital Veterinário - UnB), todas as amostras com EDTA foram processadas imediatamente para a realização de hemogramas completos. Com o auxílio de um contador semi-automático de células para uso veterinário (modelo CELM - CC550) foi determinado o número total de hemácias e leucócitos e a concentração de hemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram determinadas por cálculo padrão. O hematócrito (VG) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram preparados esfregaços de sangue total e capa de leucócitos corados com panótico e May Grunwald Giemsa (MGG) para a realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitos. As plaquetas foram diluídas em solução de Brecher (oxalato de amônio a 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer Improved<sup>®</sup>.

### **Análise Bioquímica**

Para avaliação do perfil renal e hepático dos animais, foram colhidas amostras sanguíneas e acondicionadas em tubos sem anticoagulante. O soro foi obtido após a completa coagulação sanguínea, à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos e o soro foi separado e armazenada em microtubos tipo eppendorf<sup>®</sup>. O soro foi utilizado para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais (PT), albumina, globulinas, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina.

Foram utilizados kits bioquímicos específicos (Labtest<sup>®</sup>), seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semi-automático (Bio2000 – Bioplus).

### **Extração do DNA**

Após realização do hemograma, o restante das amostras com EDTA foi congelado para posterior extração do DNA e realização da reação de polimerização em cadeia (PCR). O DNA foi extraído, no laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (MMB), com a utilização de kits comerciais (QIAamp DNA blood mini kit - Qiagen<sup>®</sup>), seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

### **PCR**

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (MMB) da UnB. Foi utilizada a água destilada como controle negativo para verificar se houve a contaminação de qualquer reagente, assim como o sangue de cão susceptível e não infectado, para verificar a especificidade da reação; como controle positivo foi utilizado sangue de um animal infectado com visualização do piroplasma de *Babesia* sp. em esfregaço sanguíneo. As sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho podem ser verificadas na Tabela 1.

Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (Biorad<sup>®</sup>).

**Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para PCR no referido trabalho.**

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5´-3´)</b>	<b>Reação utilizada</b>
<b>455-479 F</b>	GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC	<i>Babesia</i> spp.
<b>793-772 R</b>	ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA	<i>Babesia</i> spp.
<b>BCV-F</b>	GTTTCGAGTTTGCCATTCGTT	<i>B. canis vogeli</i>
<b>BCR-F</b>	GCTTGGCGGTTTGTTC	<i>B. canis rossi</i>
<b>PIRO A</b>	AATACCCAATCCTGACACAGGG	<i>Babesia</i> spp.
<b>PIRO B</b>	TTAAATACGAATGCCCCCAAC	<i>Babesia</i> spp.
<b>GAPDH F</b>	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	Inibidores da PCR
<b>GAPDH R</b>	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Inibidores da PCR
<b>DSB 370 F</b>	GATGATGTCTGAAGATATGAA ACA AAT	<i>Ehrlichia</i> sp.
<b>DSB 729 R</b>	CTGCTCGTCTATTTACTTCTTAAAGT	<i>Ehrlichia</i> sp.
<b>LFW</b>	CCTCTGGCTATAGGAAATTG	<i>Leishmania</i> sp.
<b>LBW1</b>	GGAGTGCTTAACGCGTTAG	<i>Leishmania</i> sp.
<b>LBW2</b>	CCG CCC CTATTT TAC ACC AAC CCC	<i>Leishmania</i> sp.
<b>HEP F</b>	ATACATGAGCAAAATCTCAAC	<i>Hepatozoon</i> sp.
<b>HEP R</b>	CTTATTATTCCATGCTGCAG	<i>Hepatozoon</i> sp.

**Identificação das amostras positivas para *Babesia* sp.**



Para identificação de sequências específicas do gene 18S rRNA de *Babesia* sp. foram utilizados os oligonucleotídeos 455-479F e 793-772R, resultando em um produto de 340 pares de bases (pb), descritos por Birkenheuer et al. (2003). Foram adicionados os seguintes componentes a mistura da PCR: 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,2mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 0,8 U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 5 µL de DNA de cada amostra, para um volume final de 25µL. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 50 ciclos: 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

### **Digestão Enzimática**

Das amostras positivas para *Babesia* sp. com os oligonucleotídeos 455-479F e 793-772R, foi realizada uma segunda PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B (Carret et al., 1999). Foram adicionados os seguintes componentes à mistura da PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,2mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 0,8 U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 2,0µL do DNA da amostra, para um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos repetitivos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por minuto, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta revelando um produto de 400pb.

Para caracterização molecular das amostras amplificadas com os oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B, os produtos da PCR foram submetidos à digestão enzimática utilizando as enzimas *Taq I* e *Hinf I* (Solano-Gallego et al., 2008). O seguinte

protocolo foi utilizado: 5 µl de produto amplificado da PCR foi utilizado para digestão com 10U das enzimas *Taq I* e *Hinf I*, utilizando tampão apropriado de cada enzima, ajustados para um volume final de 15 µl. As misturas foram incubadas em banho Maria a 65°C e 37°C, respectivamente, por 2 horas. Após término da incubação os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta. Os produtos digeridos foram analisados conforme Tabela 2.

**Tabela 2: Resultados esperados dos tamanhos dos fragmentos de DNA (pb) na PCR e restrição enzimática utilizando as enzimas *Taq I* e *Hinf I* para cada espécie de *Babesia*.**

Espécies de <i>Babesia</i>	Tamanho do fragmento de DNA (pb)-PCR	PCR – Restrição enzimática		Características da restrição enzimática
		Taq I (pb)	Hinf I (pb)	
<i>B. canis canis</i>	408	408	408	TaqI ( - ) Hinf ( - )
<i>B. canis vogeli</i>	407	20 + 175 + 210	407	TaqI ( + ) Hinf ( - )
<i>B. canis rossi</i>	408	408	175 + 230	TaqI ( - ) Hinf ( + )
<i>B. gibsoni</i>	406	406	200 + 205	TaqI ( - ) Hinf ( + )
<i>Theileria annae</i>	440	50 + 390	70 + 370	TaqI ( + ) Hinf ( + )

\*Solano-Gallego et al., 2008. (+) ocorre clivagem, ( - ) não ocorre clivagem

### Identificação das sub-espécies

Para identificação das amostras positivas para *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, foram realizadas reações de PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para os gene 18S rRNA da *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* descritos por Birkenheuer et al.,2003.

Para realização da PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,2mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 0,8 U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 5 µL de DNA de cada amostra, para um volume final de 25µL. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 50 ciclos: 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta resultando em um produto de 192pb (*B. canis vogeli*) e 197pb (*B. canis rossii*) nos animais positivos.

#### **Identificação de co-infecção dos animais positivos para *Babesia* spp., com *Ehrlichia* sp., *Hepatozoon* sp. e *Leishmania* sp.**

Todas as amostras positivas para *Babesia* spp., foram submetidas a análise através da PCR para diagnosticar possíveis co-infecções com outros hemoparasitas.

#### ***Hepatozoon* sp.**

Foram utilizados os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R (tabela 1), que anelam no gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp., resultando em um produto de 666 pb (Inokuma et al., 2002). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 0,8 U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 2,0µL do DNA da amostra, para um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 30 segundos em 95°C, 30 segundos em 52°C e 90 segundos em 72°C, seguidos de 5 minutos de extensão final em 72°C. Os produtos de

PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### ***Leishmania sp.***

Para *Leishmania sp.* foram utilizados 3 oligonucleotídeos (LFW e uma mistura de 1:1 de oligonucleotídeos LBW1/LBW2) que anelam na origem de replicação de ambas as fitas da molécula do minicírculo de kDNA do parasita e amplifica uma região conservada de 120 pb (Disch et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 13pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 3,3mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 1,2U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 2,0μL do DNA da amostra, em um volume final de 25μL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 10 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### ***Ehrlichia sp.***

Para verificar a ocorrência de co-infecção com *Ehrlichia sp* foram utilizados os oligonucleotídeos Dsb-330 e Dsb-728 que anelam no gene 16S rRNA e resultam em um produto de aproximadamente 400 pb (411-421pb dependendo da espécie) (Doyle et al., 2005). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen<sup>®</sup>), 0,4U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* platinum - Invitrogen<sup>®</sup>) e 5,0μL do DNA da amostra, em um volume final de 25μL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30segundos, extensão a 72°C por 30 segundos) e extensão

final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### **Avaliação da qualidade do DNA das amostras utilizadas**

Para verificar a qualidade das amostras de DNA utilizadas foi realizado uma PCR para detectar a presença de inibidores da PCR em amostras de DNA que apresentaram resultados negativos na PCR. As amostras negativas na PCR foram submetidas a uma segunda reação, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene da enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e resulta em um produto de 400pb. Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X de tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen®), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2µl de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,8U de *Taq* DNA polymerase (*Taq* platinum - Invitrogen®) e 2,0µl do DNA da amostra, em um volume total de 25µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### **Análise Estatística**

Para análise estatística, as amostras foram separadas primeiramente em animais positivos e negativos para a infecção por *Babesia* spp., de acordo com as localidades (Fercal e Lago Oeste) e em uma segunda análise estes grupos foram separados nas mesmas categorias, sem considerar a localidade (Fercal e Lago Oeste).

Após a identificação das co-infecções, os animais foram divididos em três grupos: G1, grupo dos animais positivos somente para *Babesia* spp., sem co-infecções com *Ehrlichia* sp., *Hepatozoon* sp., e *Leishmania* sp.; G2, grupo dos animais positivos para *Babesia* spp. apresentando co-infecções, com *Ehrlichia* sp., *Hepatozoon* sp. e *Leishmania* sp. e G3, grupo dos animais negativos para *Babesia* sp. Estes grupos

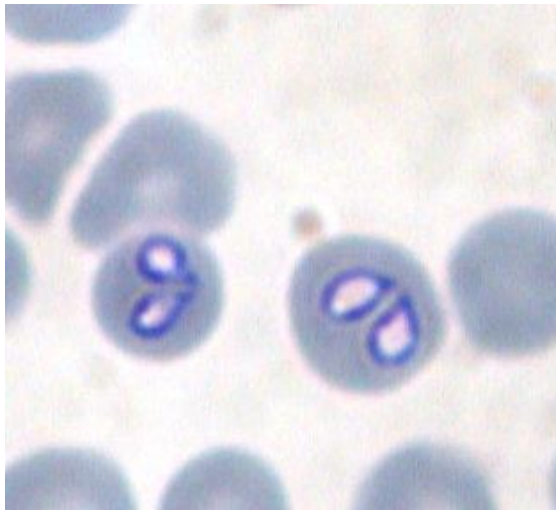
foram separados por localidade (Fercal e Lago Oeste) e em uma segunda análise foram agrupados seguindo as mesmas categorias anteriores, sem considerar o efeito local.

As variáveis, VG, número de hemácias, VCM, CHCM, número de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, PPT, número de plaquetas, ALT, AST, FA, uréia, creatinina, proteína total sérica, albumina, globulina, razão A/G foram comparados, nos diferentes grupos (positivos e negativos e G1 e G2 e G3), por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Duncan, com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS

Foram utilizadas 187 amostras de sangue de cães, sem raça definida, independente do sexo e idade. Destes animais, 124 pertenciam a região da Fercal e 63 a um abrigo de cães no Lago Oeste.

Na pesquisa de hemoparasitas nos esfregaços sanguíneos dos animais da Fercal foram encontradas 3 amostras no positivas no esfregaço sanguíneo (2,41%) para *Babesia* spp. (Figura 1), enquanto que no Lago Oeste nenhuma amostra positiva foi encontrada. Nas amostras positivas da Fercal os piroplasmas foram visualizados tanto nos esfregaços sanguíneos quanto nas bordas de orelha, contudo nos esfregaços sanguíneos foram visualizados poucos piroplasmas, indicando baixa parasitemia.



**Figura 1. *Babesia* spp. em eritrócito de cão (aumento de 100X-coloração panótico).**

Na PCR, quando se utilizou os oligonucleotídeos 455-479-F e 793-772-R foram observados produtos no tamanho de 340 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene 18S rRNA da *Babesia* spp. (Figura 2). Para confirmar a especificidade da reação, uma amostra foi enviada para o sequenciamento genético e a sequência de bases obtida foi comparada com aquelas de outros genes no Genbank utilizando-se o programa BLAST ([Basic Local Alignment Search Tool](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, resultando em 99% de similaridade com vários genótipos de *Babesia canis*.

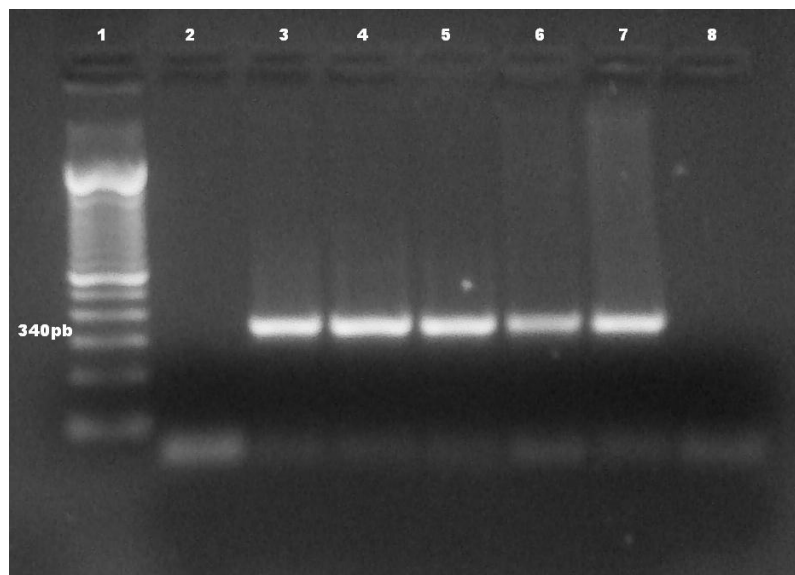


Figura 2. Resultado da PCR para o gênero *Babesia* sp., utilizando os oligonucleotídeos 455-479-F e 793-772-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos e 8: animal negativo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Os resultados dos animais positivos e negativos em ambos os locais estão apresentados na Tabela 3. Todos os animais positivos no esfregaço sanguíneo foram positivos também na PCR.

Tabela 3. Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR para o gênero *Babesia* spp. (oligonucleotídeo 455-479-F e 793-772-R) por local estudado (Fercal e Lago Oeste).

Animais	Fercal		Lago Oeste	
	Número/Total	%	Número/Total	%
Positivos	21/124	16,93	22/63	34,92
Negativos	103/124	83,07	41/63	65,08

Conforme pode ser observado na Tabela 4, a PCR se mostrou quatorze vezes mais sensível que a pesquisa de hemoparasita no esfregaço sanguíneo.



**Tabela 4. Número total e porcentagem de animais positivos para *Babesia* spp no esfregaço sanguíneo, borda de orelha e na PCR na região da Fercal e no abrigo do Lago Oeste.**

Técnica	Animais positivos/Total de animais estudados	%
Esfregaço Sanguíneo	3/187	1,60
Borda de orelha	3/187	1,60
PCR	43/187	22,99

As co-infecções observadas nos animais positivos estão apresentadas na Tabela 5 e Figuras 3, 4 e 5.

**Tabela 5. Co-infecções dos animais positivos para *Babesia* spp.**

Co-infecções	Fercal		Lago Oeste	
	Número/Total	%	Número/Total	%
<i>Leishmania spp.</i>	15/21	71,42	11/22	50,00
<i>Hepatozoon sp.</i>	3/21	14,28	16/22	72,72
<i>Ehrlichia sp.</i>	4/21	19,04	14/22	63,63

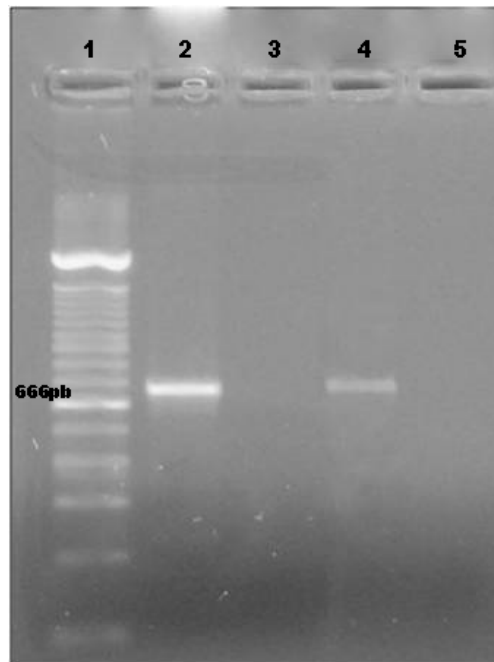


Figura 3. Gel resultante da eletroforese da PCR para o gênero *Hepatozoon* sp. utilizando os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle positivo; 3: controle negativo (água); 4: animal positivo e 5: animal negativo. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

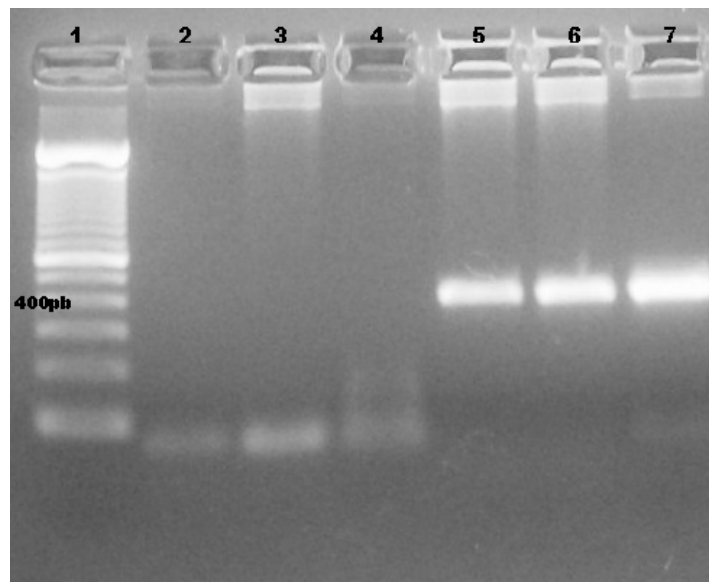


Figura 4. Resultado da PCR para o gênero *Ehrlichia* sp. utilizando os oligonucleotídeos DSB 330 e DSB 728 em amostras de sangue total. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen ®); 2: controle negativo(água); 3 e 4: animais negativos; 5, 6: animais positivos; 7: controle positivo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

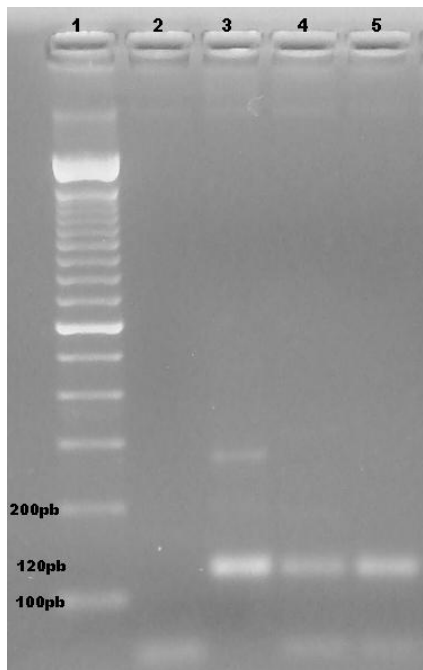


Figura 2. Resultado da PCR para o gênero *Leishmania* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos LFW e LBW1 e 2. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2: controle negativo (água) 3: controle positivo; 4 e 5: animais positivos. Gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0.01% (p/v).

Todas as amostras dos cães que foram positivas (43) com o primeiro conjunto de oligonucleotídeos utilizado (455-479-F e 793-772-R) também foram positivas com o segundo conjunto de oligonucleotídeos (PIRO A e PIRO B).

Os produtos resultantes da PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B (Figura 6), do Lago Oeste e Fercal, submetidos à digestão enzimática com as enzimas *Taq I* e *Hinf I* foram digeridos em dois sítios diferentes, resultando em fragmentos de produtos de 175 pb e 210 pb , para enzima *Taq I* e em um fragmento de 407 pb para a enzima *Hinf I* (Figura 7), conforme o esperado para *Babesia canis vogeli*; enquanto que cinco amostras apresentaram um padrão de digestão enzimática diferente, apresentando produtos de 408 pb para a enzima *Taq I* e produtos de 175 pb e 230 pb para a enzima *Hinf I* (Figura 8), conforme esperado para *Babesia canis rossi*.

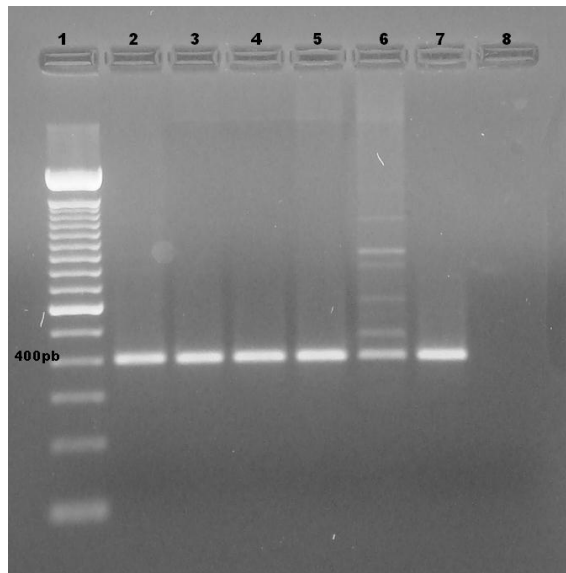


Figura 3. Resultado da PCR para o gênero *Babesia* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); 2: controle positivo; 3,4,5,6,7: animais positivos; 8: controle negativo (água). Gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

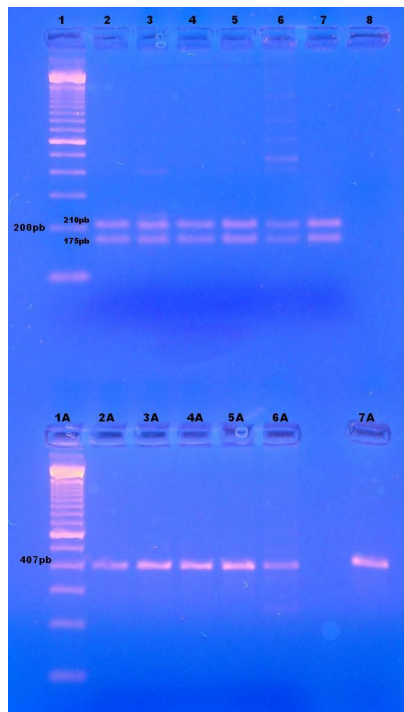


Figura 7. Resultado da digestão enzimática com as enzimas *Taq I* e *Hinf I*, dos produtos da PCR (oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R). Legenda: Superior: Digestão enzimática com a enzima *Taq I*, 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); 2: controle positivo para *Babesia canis vogeli* 3,4,5,6 e 7: animais positivos para digestão enzimática. Inferior: Digestão enzimática negativa para a enzima *Hinf I*, 1A: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); 2A: controle

positivo; 3A,4A,5A,6A e 7A: animais positivos para *Babesia canis vogeli*. Gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

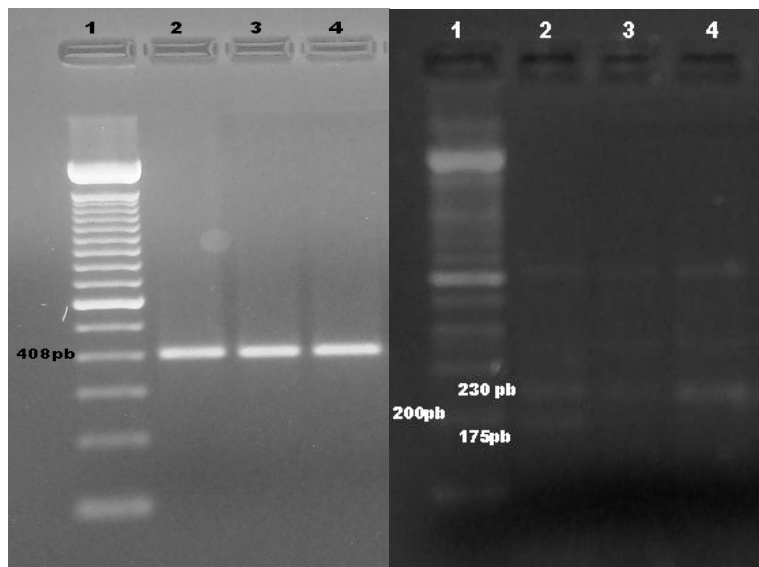


Figura 8. Resultado da digestão enzimática com as enzimas *Taq I* e *Hinf I*, dos produtos da PCR (oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R). Legenda: À esquerda, digestão enzimática negativa para enzima *Taq I*, 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2,3,e 4: amostras negativas para enzima *Taq I*. À direita, digestão enzimática positiva com a enzima *Hinf I*, 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); 2,3 e 4: amostras positivas para a enzima *Hinf I*, compatível com o diagnóstico de *Babesia canis rossii*. Gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

As amostras positivas para *B. canis vogeli* na digestão enzimática, foram confirmadas em uma nova PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (BCV-F e 793-772-R), assim como as amostras positivas para *B. canis rossii* na digestão enzimática, foram confirmadas através de uma nova PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (BCR-F e 793-772-R), conforme Figura 9.

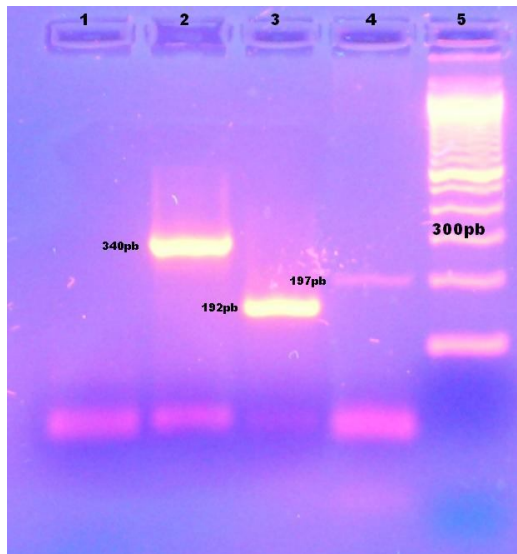


Figura 9. Resultado da PCR para o gênero *Babesia* spp., *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* utilizando-se os oligonucleotídeos 445-479-F e 793-772-R, BCV-F e 793-772-R, BCR-F e 793-772-R, respectivamente. Legenda: 1: controle negativo (água); 2: Amostra positiva para *Babesia* spp.; 3: amostra positiva para *B. canis vogeli*; 4: amostra positiva para *B. canis rossi*; 5: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen ®); Gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Todas as amostras negativas para *Babesia* spp. que foram testadas com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R, que amplificam uma parte do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, apresentaram uma banda de 400 pb, indicando êxito nas extrações de DNA (Figura 10).

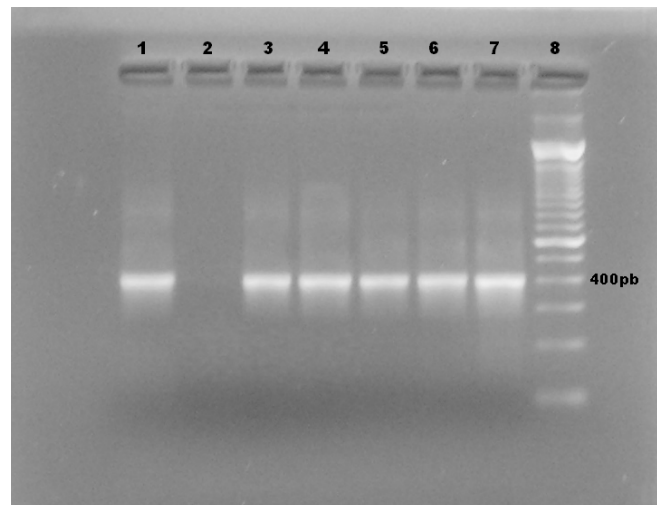


Figura 10. Resultado da PCR para o gene da enzima GAPDH, utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R. Legenda: 1: controle positivo; 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos; 8:Ladder 100pb (Invitrogen ®). Gel de agarose a 1,5%(p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais negativos e positivos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise estatística dos hemogramas completos e das bioquímicas séricas de todos os animais positivos e negativos para *Babesia* spp. da Fercal e Lago Oeste.

	POSXNEG	Média	R2	Coef. de variação	Valores de Referência	Grupo	Local	Grupo x Local
Hemograma	VG (%)	36,50	0,14	19,13	37-55 <sup>1</sup>	***	NS	NS
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,71	0,11	22,22	5,5-8,5 <sup>1</sup>	***	NS	NS
	Hemoglobina (g/dL)	13,03	0,10	21,99	12-18 <sup>1</sup>	**	**	NS
	VCM (fl)	55,27	0,01	14,70	60-77 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	CHCM (%)	32,44	0,84	9,47	30-36 <sup>1</sup>	***	***	***
	HCM (pg)	19,79	0,12	12,45	19-23 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	187,24	0,01	69,98	200-500 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	PPT (g/dL)	7,20	0,09	16,99	6,0-8,0 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Leucócitos (X10 <sup>3</sup> / μL)	11,76	0,01	40,47	6,00-17,00 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Bastonetes (/ μL)	11,22	0,04	387,98	0-300 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Neutrófilos (X10 <sup>3</sup> / μL)	6,21	0,01	52,57	3,00-11,50 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	3,17	0,04	84,19	1,00- 4,80 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Eosinófilos (X10 <sup>3</sup> / μL)	1,42	0,04	90,03	0,10-1,25 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,84	0,03	66,77	0,15- 1,35 <sup>1</sup>	NS	*	NS
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,26	0,06	0,29	Raros <sup>1</sup>	NS	**	NS
Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	35,31	0,05	48,00	21,4-59,92 <sup>2</sup>	NS	**	NS
	Creatinina (mg/dL)	1,02	0,01	107,51	0,5-1,5 <sup>2</sup>	NS	NS	NS
	ALT (UI/L)	30,20	0,00	47,11	21-102 <sup>2</sup>	NS	NS	NS
	AST (UI/L)	33,85	0,02	49,77	23-66 <sup>2</sup>	NS	NS	NS
	FA (UI/L)	40,71	0,12	113,17	20-156 <sup>2</sup>	*	**	NS
	PT sérica (g/dL)	7,60	0,17	22,40	5,4-7,1 <sup>2</sup>	NS	***	NS
	Albumina (g/dL)	2,15	0,13	26,60	2,6-3,3 <sup>2</sup>	NS	***	NS
	Globulina (g/dL)	5,47	0,12	32,79	2,7-4,4 <sup>2</sup>	NS	***	NS

Razão A/G	0,46	0,02	60,04	0,59-1,11 <sup>2</sup>	NS	NS	NS
-----------	------	------	-------	------------------------	----	----	----

Onde  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ , POSITIVOS X NEGATIVOS (POSxNEG) , Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas dos animais positivos e negativos estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico nos cães positivos e negativos para a infecção por *Babesia* spp. do abrigo de cães do Lago Oeste.**

	Parâmetro LO	POSITIVOS	NEGATIVOS	Valores de referência
Hemograma	VG (%)	37,00±6,28 <sup>a</sup>	37,43±4,65 <sup>a</sup>	37-55 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,60±1,50 <sup>a</sup>	6,67±0,76 <sup>a</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	13,34±12,39 <sup>a</sup>	14,06±1,06 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	56,88±7,35 <sup>a</sup>	56,24±10,38 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	36,00±0,88 <sup>a</sup>	37,70±2,70 <sup>a</sup>	30-36 <sup>1</sup>
	HCM (pg)	20,50±2,90 <sup>a</sup>	21,11±1,54 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	159,00±74,19 <sup>a</sup>	173,78±74,87 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,72±1,35 <sup>a</sup>	7,75±1,07 <sup>a</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos (X10 <sup>3</sup> /μL)	10,44±3524 <sup>a</sup>	12,41±54,98 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	0±0 <sup>a</sup>	4,90±31,39 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	4,48±2,74 <sup>a</sup>	6,54±3,79 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	44,08±4,36 <sup>a</sup>	3,76±4,10 <sup>a</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	1,00±0,38 <sup>a</sup>	1,33±0,81 <sup>a</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,65±0,30 <sup>a</sup>	0,71±0,53 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,01±0,03 <sup>a</sup>	0,057±0,11 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	44,20±12,39 <sup>a</sup>	40,78±13,48 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)		0,90±0,10 <sup>a</sup>	0,95±0,27 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
ALT (UI/L)		28,80±13,59 <sup>a</sup>	31,34±13,92 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
AST (UI/L)		40,80±14,32 <sup>a</sup>	36,82±22,54 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
FA (UI/L)		23,40±7,12 <sup>a</sup>	22,73±9,52 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>



PT sérica (g/dL)	8,76±1,79 <sup>a</sup>	8,73±1,88 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
Albumina (g/dL)	2,31±0,34 <sup>a</sup>	2,46±0,56 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
Globulina (g/dL)	6,44±1,99 <sup>a</sup>	6,40±2,12 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
Razão A/G	0,39±0,13 <sup>a</sup>	0,50±0,41 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

**Tabela 8. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por *Babesia spp.* da Fercal.**

	Parâmetro FE	POSITIVOS	NEGATIVOS	Valores de referência
Hemograma	VG (%)	31,00±6,80 <sup>a</sup>	38,17±7,94 <sup>b</sup>	37-55 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	5,76±1,70 <sup>a</sup>	7,12±1,66 <sup>b</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	11,22±2,67 <sup>a</sup>	13,19±3,38 <sup>b</sup>	12-18 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	55,70±10,70 <sup>a</sup>	54,47±8,08 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	28,65±3,90 <sup>a</sup>	34,94±2,91 <sup>b</sup>	30-36 <sup>1</sup>
	HCM (pg)	19,89±2,52 <sup>a</sup>	18,99±2,76 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	178,35±154,32 <sup>a</sup>	199,99±144,41 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,21±1,65 <sup>a</sup>	6,88±1,07 <sup>a</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos (X10 <sup>3</sup> /μL)	11,77±4,86 <sup>a</sup>	11,50±4,30 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	2,9±0,62 <sup>a</sup>	8,02(±40,48) <sup>b</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	6,24±3,69 <sup>a</sup>	6,13±2,74 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos (X10 <sup>3</sup> / μL)	3,50±2,12 <sup>a</sup>	2,66±1,56 <sup>b</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	1,00±0,69 <sup>a</sup>	1,67±1,62 <sup>b</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>
	Monócitos (X10 <sup>3</sup> / μL)	0,98±0,74 <sup>a</sup>	0,86±0,48 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,01±0,05 <sup>a</sup>	0,01±0,06 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
Bioquímica sérica	Uréia (mg/dL)	32,66 ±17,63 <sup>a</sup>	33,32 ±19,21 <sup>a</sup>	21,4-59,92 <sup>2</sup>
	Creatinina (mg/dL)	0,96±1,11 <sup>a</sup>	1,28±1,66 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
	ALT (UI/L)	29,41±12,45 <sup>a</sup>	30,87±17,96 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
	AST (UI/L)	31,53±12,71 <sup>a</sup>	34,53±17,01 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
	FA (UI/L)	39,05±48,42 <sup>a</sup>	71,41±66,37 <sup>b</sup>	20-156 <sup>2</sup>

PT sérica (g/dL)	7,03±1,41 <sup>a</sup>	7,32±2,01 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
Albumina (g/dL)	2,11±0,58 <sup>a</sup>	1,83±0,57 <sup>b</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
Globulina (g/dL)	4,91±1,91 <sup>a</sup>	5,49±2,08 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
Razão A/G	0,47±0,20 <sup>a</sup>	0,39±0,19 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

**Tabela 9. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por *Babesia* sp. das duas localidades (Fercal e Lago Oeste).**

Parâmetro	POSITIVOS	NEGATIVOS	Valores de referência	
VG (%)	34,66±6,48 <sup>a</sup>	38,10±7,82 <sup>b</sup>	37-55 <sup>1</sup>	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,28±1,32 <sup>a</sup>	7,09±1,64 <sup>b</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>	
Hemoglobina (g/dL)	12,83±2,54 <sup>a</sup>	13,20±3,32 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>	
VCM (fl)	54,62±8,04 <sup>a</sup>	56,01±8,02 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>	
CHCM (%)	29,50±10,03 <sup>a</sup>	35,00±2,84 <sup>b</sup>	30-36 <sup>1</sup>	
HCM (pg)	20,58±2,10 <sup>a</sup>	19,08±2,78 <sup>b</sup>	19-23 <sup>1</sup>	
Hemograma	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	175,75±115,00 <sup>a</sup>	197,46±1411,16 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,52±1,37 <sup>a</sup>	6,90±1,09 <sup>b</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	11,43±5,20 <sup>a</sup>	12,14±4,25 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	15,47±48,65 <sup>a</sup>	7,54±39,27 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	6,41±3,73 <sup>a</sup>	6,03±2,74 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	3,65±3,37 <sup>a</sup>	2,76±1,84 <sup>b</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	1,63±0,77 <sup>a</sup>	1,63±1,58 <sup>b</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,83±0,64 <sup>a</sup>	0,85±0,48 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,03±0,09 <sup>a</sup>	0,01±0,06 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	33,36±17,52 <sup>a</sup>	37,56±16,49 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)		0,96±1,07 <sup>a</sup>	1,09±1,11 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
ALT (UI/L)		29,37±12,44 <sup>a</sup>	31,13±15,67 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
AST (UI/L)		32,12±12,92 <sup>a</sup>	35,80±20,17 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
FA (UI/L)		38,09±47,08 <sup>a</sup>	43,69±50,02 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>
PT sérica (g/dL)		7,13±1,49 <sup>a</sup>	8,13±2,05 <sup>b</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
Albumina (g/dL)		2,12±0,56 <sup>a</sup>	2,19±0,64 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
Globulina (g/dL)		5,01±1,49 <sup>a</sup>	6,01±2,14 <sup>b</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
Razão A/G	0,46±0,20 <sup>a</sup>	0,45±0,34 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>	

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas de G1, G2 e G3 do abrigo de cães do Lago Oeste estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados pelos animais positivos somente para *Babesia* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Babesia* spp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Babesia* sp. (G3) do abrigo do Lago Oeste.**

Parâmetro	G1	G2	G3	Valores de referência	Valores em uma mesma linha seguido s por letras diferentes
VG (%)	37,4±4,6 <sup>a</sup>	37,4±4,8 <sup>a</sup>	37,0±6,2 <sup>a</sup>	37-55 <sup>1</sup>	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,64±0,76 <sup>a</sup>	6,71±0,79 <sup>a</sup>	6,60±1,50 <sup>a</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>	
Hemoglobina (g/dL)	14,02±1,58 <sup>a</sup>	14,10±1,67 <sup>a</sup>	13,34±2,39 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>	
VCM (fl)	56,52±5,45 <sup>a</sup>	55,91±5,43 <sup>a</sup>	56,88±7,35 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>	
CHCM (%)	37,59±2,69 <sup>a</sup>	37,82±2,78 <sup>a</sup>	36,00±0,88 <sup>a</sup>	30-36 <sup>1</sup>	
HCM (pg)	21,16±1,53 <sup>a</sup>	21,06±1,59 <sup>a</sup>	20,50±2,90 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>	
Hemograma Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	177,95±74,90 <sup>a</sup>	168,94±76,58 <sup>a</sup>	159,00±74,19 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>	(p<0,05) entre si pelo Teste de Duncan
PPT (g/dL)	7,76±1,06 <sup>a</sup>	7,74±1,10 <sup>a</sup>	7,72±1,35 <sup>a</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>	
Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	12,91±6,18 <sup>a</sup>	11,83±4,67 <sup>a</sup>	10,44±3,52 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>	
Bastonetes (/ μL)	9,1±42,8 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>	
Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	6,65±3,86 <sup>a</sup>	6,42±3,4 <sup>a</sup>	4,48±2,60 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>	
Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	4,11±5,02 <sup>a</sup>	3,35±2,76 <sup>a</sup>	4,40±4,36 <sup>a</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>	
Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	1,34±0,84 <sup>a</sup>	1,32±0,79 <sup>a</sup>	1,00±0,38 <sup>a</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>	
Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,73±0,58 <sup>a</sup>	0,69±0,49 <sup>a</sup>	0,65±0,30 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>	
Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,06±0,13 <sup>a</sup>	0,04±0,07 <sup>a</sup>	0,01±0,03 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>	
Bioquímica Sérica Uréia (mg/dL)	40,8±14,4 <sup>a</sup>	40,7±12,6 <sup>a</sup>	44,2±12,3 <sup>a</sup>	21,4-59,92 <sup>2</sup>	Médio (VCM), Concen tração de Hemogl obina
Creatinina (mg/dL)	0,94±0,27 <sup>a</sup>	0,96±0,28 <sup>a</sup>	0,90±0,10 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>	
ALT (UI/L)	31,50±13,92 <sup>a</sup>	31,15±14,81 <sup>a</sup>	28,80±13,59 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>	
AST (UI/L)	36,95±22,43 <sup>a</sup>	36,66±23,32 <sup>a</sup>	40,80±14,32 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>	
FA (UI/L)	22,40±10,25 <sup>a</sup>	23,10±8,86 <sup>a</sup>	23,40±7,12 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>	
PT sérica (g/dL)	8,82±1,87 <sup>a</sup>	8,63±1,93 <sup>a</sup>	8,76±1,79 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>	
Albumina (g/dL)	2,45±0,56 <sup>a</sup>	2,47±0,58 <sup>a</sup>	2,31±0,34 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>	
Globulina (g/dL)	6,49±2,10 <sup>a</sup>	6,30±2,18 <sup>a</sup>	6,44±1,99 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>	
Razão A/G	0,48±0,41 <sup>a</sup>	0,51±0,43 <sup>a</sup>	0,39±0,13 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>	

Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas de G1, G2 e G3 dos cães da Fercal estão apresentados nas Tabela 11. Na Tabela 12 estão apresentados os mesmos resultados de G1, G2 e G3, porém das duas localidades (Fercal e Lago Oeste).

**Tabela 11. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos somente para *Babesia* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Babesia* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Babesia* sp. (G3) da Fercal.**

	Parâmetro	G1	G2	G3	Valores de referência <sup>1/2</sup>
Hemograma	VG (%)	30,8±7,2 <sup>a</sup>	31,4±6,1 <sup>a</sup>	38,1±7,9 <sup>b</sup>	37-55 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	5,66±1,61 <sup>a</sup>	5,96±1,96 <sup>a</sup>	7,12±1,66 <sup>b</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	11,16±2,70 <sup>a</sup>	11,35±2,76 <sup>a</sup>	13,19±3,38 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	55,8±10,90 <sup>a</sup>	55,37±10,82 <sup>a</sup>	54,47±8,08 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	27,59±4,08 <sup>a</sup>	27,66±3,71 <sup>a</sup>	34,94±2,91 <sup>b</sup>	30-36 <sup>1</sup>
	HCM (pg)	20,03±2,66 <sup>a</sup>	19,58±2,3 <sup>a</sup>	18,99±2,76 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	178,40±157,74 <sup>a</sup>	178,25±155,21 <sup>a</sup>	199,99±144,41 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,13±1,56 <sup>a</sup>	7,40±1,90 <sup>a</sup>	6,88±1,07 <sup>a</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	11,45±5,06 <sup>a</sup>	12,46±4,59 <sup>a</sup>	11,50±4,30 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	30,95±65,2 <sup>a</sup>	26,3±60,3 <sup>a</sup>	8,0±40,4 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	6,07±3,76 <sup>a</sup>	6,61±3,72 <sup>a</sup>	6,13±2,74 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	3,32±2,17 <sup>ab</sup>	3,86±2,10 <sup>a</sup>	2,66±1,56 <sup>b</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	1,00±0,78 <sup>a</sup>	0,99±0,48 <sup>a</sup>	1,67±1,62 <sup>a</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	1,00±0,79 <sup>a</sup>	0,95±0,66 <sup>a</sup>	0,86±0,48 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,01±0,06 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0,01±0,06 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>	
Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	32,1±17,8 <sup>a</sup>	35,8±22,6 <sup>a</sup>	32,6±17,6 <sup>a</sup>	21,4-59,92 <sup>2</sup>
	Creatinina (mg/dL)	1,37±1,84 <sup>a</sup>	1,09±1,27 <sup>a</sup>	0,96±1,16 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
	ALT (UI/L)	30,52±18,84 <sup>a</sup>	31,60±16,88 <sup>a</sup>	29,41±12,45 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
	AST (UI/L)	35,12±18,07 <sup>a</sup>	33,28±15,39 <sup>a</sup>	31,53±12,71 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
	FA (UI/L)	70,95±63,16 <sup>a</sup>	72,40±76,27 <sup>a</sup>	39,05±48,42 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>
	PT sérica (g/dL)	7,21±1,82 <sup>a</sup>	7,56±2,46 <sup>a</sup>	7,03±1,41 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
	Albumina (g/dL)	1,88±0,57 <sup>a</sup>	1,72±0,59 <sup>a</sup>	2,11±0,58 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
	Globulina (g/dL)	2,53±1,90 <sup>a</sup>	5,83±2,49 <sup>a</sup>	4,91±1,41 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
Razão A/G	0,40±0,19 <sup>a</sup>	0,36±0,20 <sup>a</sup>	0,47±0,20 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>	

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular

Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

**Tabela 12. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímico sérico apresentados pelos animais positivos somente para *Babesia* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Babesia* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Babesia* sp. (G3) nas duas localidades.**

	Parâmetro	G1	G2	G3	Valores de referência <sup>1/2</sup>
Hemograma	VG (%)	34,20±6,84 <sup>a</sup>	35,34±5,96 <sup>ab</sup>	38,10±7,82 <sup>b</sup>	37-55 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,16±1,33 <sup>b</sup>	6,45±1,33 <sup>b</sup>	7,09±1,64 <sup>a</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	12,62±2,61 <sup>a</sup>	13,15±2,45 <sup>a</sup>	13,20±3,32 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	56,20±8,46 <sup>a</sup>	55,73±7,52 <sup>a</sup>	54,62±8,02 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	28,33±10,17 <sup>a</sup>	31,23±9,74 <sup>b</sup>	35,00±2,84 <sup>c</sup>	30-36 <sup>1</sup>
	HCM (pg)	20,61±2,20 <sup>a</sup>	20,55±1,56 <sup>a</sup>	19,08±2,78 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	178,17±121,05 <sup>a</sup>	172,15±107,39 <sup>a</sup>	197,46±141,16 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,45±1,35 <sup>a</sup>	7,62±1,41 <sup>a</sup>	6,93±1,09 <sup>b</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	12,20±5,64 <sup>a</sup>	12,04±4,57 <sup>a</sup>	11,43±4,25 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	19,79±55,37 <sup>a</sup>	9,06±36,49 <sup>a</sup>	7,54±39,27 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	6,37±3,78 <sup>a</sup>	6,48±3,72 <sup>a</sup>	6,03±2,74 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	3,73±3,87 <sup>a</sup>	3,53±2,52 <sup>a</sup>	2,76±1,84 <sup>a</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	1,17±0,82 <sup>a</sup>	1,21±0,71 <sup>a</sup>	1,63±1,58 <sup>a</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,86±0,70 <sup>a</sup>	0,78±0,56 <sup>a</sup>	0,85±0,48 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,04±0,11 <sup>a</sup>	0,03±0,06 <sup>a</sup>	0,01±0,06 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	36,58±16,60 <sup>a</sup>	39,03±16,51 <sup>a</sup>	33,36±17,52 <sup>a</sup>	21,4-59,92 <sup>2</sup>
	Creatinina (mg/dL)	1,15±1,30 <sup>a</sup>	1,01±0,76 <sup>a</sup>	0,96±1,07 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
	ALT (UI/L)	31,02±16,31 <sup>a</sup>	31,31±14,94 <sup>a</sup>	29,37±12,44 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
	AST (UI/L)	36,04±20,14 <sup>a</sup>	35,45±20,59 <sup>a</sup>	32,12±12,92 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
	FA (UI/L)	46,11±50,55 <sup>a</sup>	40,10±49,89 <sup>a</sup>	38,09±47,08 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>
	PT sérica (g/dL)	8,03±1,99 <sup>a</sup>	8,26±2,16 <sup>a</sup>	7,13±1,49 <sup>b</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>

Albumina (g/dL)	2,18±0,63 <sup>a</sup>	2,21±0,68 <sup>a</sup>	2,12±0,56 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
Globulina (g/dL)	5,92±2,07 <sup>a</sup>	6,14±2,26 <sup>a</sup>	5,01±1,49 <sup>b</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
Razão A/G	0,44±0,32 <sup>a</sup>	0,46±0,37 <sup>a</sup>	0,46±0,20 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados das freqüências das principais alterações do hemograma e da bioquímica sérica dos animais infectados somente com *Babesia spp.* sem co-infecções.

**Tabela 13. Freqüência das alterações hematológicas e bioquímicas dos animais infectados somente com *Babesia spp.* sem co-infecção com *Hepatozoon*, *Ehrlichia* e *Leishmania* (G1).**

Alterações Laboratoriais	Número de animais/total de animais de G1	%
Anemia	26/43	60,46
Normocítica Hipocrômica	6/26	23,07
Microcítica Normocrômica	11/26	42,30
Microcítica Hipocrômica	9/26	34,61
Leucocitose	6/43	13,95
Leucopenia	3/43	6,97
Neutrofilia	4/43	9,30
Neutropenia	5/43	11,62
Linfocitose	8/43	18,60
Linfopenia	3/43	6,97
Monocitose	37/43	86,04
Eosinofilia	14/43	32,55
Basofilia	8/43	18,60
Trombocitopenia	27/43	62,79
Hiperproteinemia plasmática	14/43	32,55
Hipoproteinemia plasmática	4/43	9,30
Aumento da concentração sérica de uréia	4/43	9,30
Diminuição da concentração sérica de uréia	4/43	9,30

Aumento da concentração sérica creatinina	2/43	4,65
Diminuição da concentração sérica de ALT	5/43	11,62
Diminuição da concentração sérica de AST	11/43	25,58
Aumento da concentração sérica de AST	3/43	6,97
Diminuição da concentração sérica de FA	8/43	18,60
Aumento da concentração sérica de FA	3/43	6,97
Hipoproteinemia sérica	3/43	6,97
Hiperproteinemia sérica	30/43	69,76
Hipoalbuminemia sérica	25/43	58,13
Hiperglobulinemia sérica	2/43	4,65
Diminuição da razão A/G	34/43	79,06

Legenda: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA) e Albumina/Globulina (A/G).

Na Tabela 14, encontram-se as freqüências de cães positivos para cada sub-espécie de *Babesia canis*.

**Tabela 14. Número total e porcentagem de animais positivos para *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*, nas duas localidades (Fercal e Lago Oeste).**

Sub-espécie	Animais positivos/Total de animais estudados	%
<i>Babesia canis vogeli</i>	38/43	88,37
<i>Babesia canis rossi</i>	5/43	11,63

O número total e a porcentagem de animais positivos para *Babesia canis vogeli* e *B. canis rossi* por localidade encontram-se na Tabela 15.

**Tabela 15. Número total e porcentagem de animais positivos *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi* na região da Fercal e no abrigo do Lago Oeste.**

	Fercal	Lago Oeste
--	--------	------------



Sub-espécies				
	Número/Total	%	Número/Total	%
<i>B. canis vogeli</i>	20/21	95,24	18/22	81,82
<i>B. canis rossi</i>	1/21	4,76	4/22	18,18

Na Tabela 16, encontram-se os valores médios e desvio padrão dos resultados hematológicos e bioquímicos séricos dos animais infectados por *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*.

**Tabela 16. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e da bioquímica sérica apresentados nos animais infectados com *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*.**

	Parâmetro	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. canis rossi</i>	Valores de referência
Hemograma	VG (%)	33,89±6,88 <sup>a</sup>	38,00±5,78 <sup>a</sup>	37-55 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,10±1,30 <sup>a</sup>	6,80±1,42 <sup>a</sup>	5,5-8,5 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	12,52±2,66 <sup>a</sup>	13,56±2,00 <sup>a</sup>	12-18 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	56,21±8,55 <sup>a</sup>	56,75±7,69 <sup>a</sup>	60-77 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	28,03±10,27 <sup>a</sup>	31,90±8,79 <sup>b</sup>	30-36 <sup>1</sup>
	HCM (pg)	20,65±2,22 <sup>a</sup>	20,19±2,03 <sup>a</sup>	19-23 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	181,53±123,21 <sup>a</sup>	167,50±64,71 <sup>a</sup>	200-500 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	7,48±1,41 <sup>a</sup>	7,36±0,43 <sup>a</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	12,09±5,70 <sup>a</sup>	13,24±4,88 <sup>a</sup>	6,00-17,00 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	14,58±48,76 <sup>a</sup>	56,40±88,11 <sup>a</sup>	0-300 <sup>1</sup>
	Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	6,19±3,77 <sup>a</sup>	7,31±3,74 <sup>a</sup>	3,00-11,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	3,89±4,03 <sup>a</sup>	3,31±2,68 <sup>a</sup>	1,00- 4,80 <sup>1</sup>
	Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	1,03±0,68 <sup>a</sup>	1,79±1,53 <sup>a</sup>	0,10-1,25 <sup>1</sup>

	Monócitos( $X10^3/\mu\text{L}$ )	0,87±0,68 <sup>a</sup>	0,73±0,84 <sup>a</sup>	0,15- 1,35 <sup>1</sup>
	Basófilos ( $X10^3/\mu\text{L}$ )	0,04±0,11 <sup>a</sup>	0,02±0,05 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	36,71±17,36 <sup>a</sup>	32,00±9,00 <sup>a</sup>	21,4-59,92 <sup>2</sup>
	Creatinina (mg/dL)	1,18±1,36 <sup>a</sup>	0,92±0,31 <sup>a</sup>	0,5-1,5 <sup>2</sup>
	ALT (UI/L)	31,61±16,97 <sup>a</sup>	29,80±11,16 <sup>a</sup>	21-102 <sup>2</sup>
	AST (UI/L)	34,83±21,17 <sup>a</sup>	37,60±14,44 <sup>a</sup>	23-66 <sup>2</sup>
	FA (UI/L)	48,53±52,41 <sup>a</sup>	21,00±11,37 <sup>a</sup>	20-156 <sup>2</sup>
	PT sérica (g/dL)	8,04±2,04 <sup>a</sup>	8,18±1,60 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
	Albumina (g/dL)	2,15±0,65 <sup>a</sup>	2,39±0,33 <sup>a</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
	Globulina (g/dL)	5,89±2,08 <sup>a</sup>	6,34±1,95 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>
	Razão A/G	0,45±0,33 <sup>a</sup>	0,40±0,13 <sup>a</sup>	0,59-1,11 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>.

Os resultados das freqüências das principais alterações hematológicas e da bioquímica sérica dos animais infectados por *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi* encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17. Freqüência das alterações hematológicas e bioquímicas dos animais infectados *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*.**

Alterações Laboratoriais	B. canis vogeli		B. canis rossi	
	Nºanimais/ Total	%	Nºanimais/ Total	%
Anemia	25/38	65,78	1/5	20
Normocítica Hipocrômica	5/25	20	1/1	100
Microcítica Normocrômica	11/25	44	0/1	0
Microcítica Hipocrômica	9/25	36	0/1	0
Leucocitose	5/38	13,15	1/5	20
Leucopenia	3/38	7,89	0/5	0
Neutrofilia	3/38	7,89	1/5	20
Neutropenia	5/38	13,15	0/5	0
Linfocitose	7/38	18,42	1/5	20
Linfopenia	3/38	7,89	0/5	0

Monocitose	34/38	89,47	3/5	60
Eosinofilia	13/38	32,21	1/5	20
Basofilia	7/38	18,42	1/5	20
Trombocitopenia	23/38	60,52	4/5	80
Hiperproteinemia plasmática	14/38	36,84	0/5	0
Hipoproteinemia plasmática	4/38	10,52	0/5	0
Aumento da concentração sérica de uréia	4/38	10,52	0/5	0
Diminuição da concentração sérica de uréia	4/38	10,52	0/5	0
Aumento da concentração sérica creatinina	2/38	5,26	0/5	0
Diminuição da concentração sérica de ALT	5/38	13,15	0/5	0
Diminuição da concentração sérica de AST	10/38	26,31	1/5	20
Aumento da concentração sérica de AST	3/38	7,89	0/5	0
Diminuição da concentração sérica de FA	8/38	21,05	3/5	60
Aumento da concentração sérica de FA	3/38	7,89	0/5	0
Hipoproteinemia sérica	3/38	7,89	0/5	0
Hiperproteinemia sérica	26/38	68,42	4/5	80
Hipoalbuminemia sérica	23/38	60,52	2/5	40
Hiperglobulinemia sérica	29/38	76,31	4/5	80
Diminuição da razão A/G	30/38	78,94	4/5	80

Legenda: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA) e Albumina/Globulina (A/G).

## DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a infecção por *Babesia* spp. é muito comum em cães no Distrito Federal. Os cães da região da Fercal apresentaram 16,93% de infecção para este parasita (Tabela 3). Valores muito inferiores foram encontrados por Miranda et al. (2008), que obtiveram freqüência de 1,47% em cães do Campos dos Goytacazes no Rio de Janeiro. Porém, em outro estudo realizado por Ungar de Sá et al. (2007), em Salvador e região metropolitana da Bahia, a freqüência de infecção por *Babesia* spp. foi muito superior (33,95%). Contudo a metodologia de trabalho utilizada foi diferente, onde estes utilizaram para estudo apenas os animais com suspeita de hemoparasitose, enquanto que o presente trabalho foram considerados todos os cães da região, independente de apresentar sintomatologia clínica.

Quando observamos os cães pertencentes a um abrigo do Lago Oeste, a ocorrência da infecção por *Babesia* spp. foi de 34,92%, praticamente o dobro da ocorrência da região da Fercal, denotando claramente um efeito local quanto a susceptibilidade a mesma fonte de infecção. Tal fato não foi observado quando se utilizou um número maior de cães, Fercal, e que viviam em ambientes diferentes, embora da mesma região periurbana.

Dentre as amostras analisadas, em 1,6% foi identificada a presença de *Babesia* spp. no esfregaço sanguíneo, enquanto que 22,99% das amostras foram positivas na PCR para *Babesia* spp. (Tabela 4), utilizando-se os oligonucleotídeos 455-479-F e 793-772-R. A discrepância entre os resultados da PCR e da análise citológica, reafirmam a maior sensibilidade do teste molecular para a detecção dos parasitas. Estudos realizados por Passos et al., (2005), comprovam que a técnica de pesquisa de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo é mais adequada para o diagnóstico da fase aguda da infecção, apresentando resultados falsos negativos em fase de baixa parasitemia. Métodos moleculares, como a PCR, apresentam maior sensibilidade e especificidade que o método da avaliação do esfregaço sanguíneo para a detecção da infecção por *Babesia* spp. no sangue periférico e pode ainda diferenciar as espécies e

sub-espécies, que não podem ser diferenciadas morfológicamente pelo método do esfregaço sanguíneo (Sá et al., 2006).

A co-infecção de hemoparasitas no cão não é rara e, pode ser facilitada pelo fato do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ser o principal vetor das parasitoses mais comuns que infectam cães, como *Babesia* sp., *Hepatozoon* sp. e *Ehrlichia canis* (Mundim et al., 2008; Santos et al., 2009). Em muitos casos, a infecção por *Babesia* sp. pode ser agravada pela presença de outros hemoparasitas nos cães (Boozer & Macintire, 2003). No presente estudo, 26 animais apresentaram infecções concomitantes e a *Leishmania* sp. foi o agente mais freqüentemente encontrado em associação com a *Babesia* spp. em ambas localidades (Tabela 5). Este aumento na freqüência pode ser explicado pelo fato de que as regiões estudadas são endêmicas para leishmaniose no Distrito Federal. A associação de *Babesia* spp. com *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia* sp. pode ser atribuída à presença do vetor, o carrapato *R. sanguineus* que é comum as três infecções (Gondim et al., 1998; O'Dwyer & Massard, 2002).

A babesiose é uma doença conhecida em todo o mundo como causadora de anemia hemolítica (Boozer e Macintire, 2003), mas a anemia algumas vezes pode não estar presente. Três hipóteses de mecanismos de hemólise na babesiose canina tem sido relatado: mecânica, imuno-mediada ou tóxica – causada pela produção de um fator hemolítico pelos parasitas (Bourdeau e Guelfi, 1995). Contudo, cabe salientar que 39,5% dos cães com babesiose não apresentaram anemia neste estudo, ressaltando a importância para o clínico da utilização de métodos auxiliares de diagnóstico, principalmente a pesquisa de hemoparasitas em regiões onde os cães apresentam elevada infestação de carrapatos, para servir como diagnóstico diferencial de outras enfermidades.

O tipo de anemia mais freqüentemente encontrada na babesiose canina é a anemia normocítica normocrômica (Furlanello et al., 2005), contudo no presente trabalho o tipo mais encontrado foi a anemia microcítica normocrômica (Tabela 13). Estas variações podem ser decorrentes do estágio da doença, da espécie e sub-espécie envolvida (Thrall, 2007). A anemia normocítica normocrômica pode ser observada na fase aguda da doença, quando os piroplasmas são facilmente visualizados no esfregaço sanguíneo ou na borda de orelha, porém ainda sem tempo

de resposta medular levando a característica arregenerativa e momentânea da anemia (Miranda et al., 2008). Podemos propor que a anemia microcítica hipocrômica observada nos animais positivos, não foi ocasionada exclusivamente pela infecção por *Babesia* spp., uma vez que quando analisamos os grupos unindo ambas as localidades, os animais do G1 (composto somente por animais positivos para o gênero *Babesia* sem co-infecções com *Hepatozoon canis*, *Leishmania* sp., ou *Ehrlichia* sp.) e do G2 (animais positivos com co-infecções) não diferiram significativamente entre eles, ambos apresentaram anemia microcítica hipocrômica, e diferiram significativamente dos animais do G3 (cães negativos para *Babesia* spp.) (Tabela 12). A anemia microcítica pode ocorrer devido à perda de sangue (hemorragias), em caso de hemorragias crônicas e à deficiência nutricional, com déficit de fatores essenciais, como o ferro e o cobre, ou baixos índices de fatores hematopoiéticos, como as vitaminas B6 e riboflavina e no desvio porto-sistêmico (Harvey, 2000). Estudando as alterações hematológicas, Alencar et al. (2002) declaram que a deficiência de ferro é a causa mais freqüente de anemia, devido à dieta deficiente ou hemorragias crônicas. Os animais deste estudo, por serem de proprietários de baixa renda, provavelmente não possuem uma dieta balanceada, o que pode ter ocasionado um déficit dos componentes da maturação dos eritrócitos. É válido salientar que todos os animais do estudo apresentavam ectoparasitas, e é sabido que a infestação por ectoparasitas, assim como, por endoparasitos podem aumentar as chances destes cães em desenvolverem este tipo de anemia.

Leucopenia ou leucocitose têm sido descritos em diferentes estágios da babesiose (Guelfi e Candebat, 1998), contudo a leucopenia têm se mostrado um achado importante na fase aguda da doença (Baric Rafaj et al., 2007). Neste estudo, conforme apresentado na Tabela 12, não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de leucócitos. Dentre as alterações observadas no leucograma dos animais positivos (Tabela 13), podemos ressaltar que a monocitose esteve presente em 86,04% dos animais infectados. Estudos realizados por Guimarães et al. (2004), revelaram monocitose. As vacuolizações encontradas no citoplasma destes monócitos servem de indicação do aumento da sua atividade fagocitária para a remoção dos hemoparasitas presentes (Bienzle, 2000), conforme observado no presente estudo.

Ao compararmos os valores de linfócitos e eosinófilos dos animais positivos com os animais negativos (Tabela 9), podemos observar que houve diferença estatística entre os positivos e negativos, mas apenas o número total de eosinófilos apresentaram-se acima dos valores de referência para a espécie canina. A eosinofilia apresentada por 32,55% dos animais positivos, difere dos achados de Zygmier et al. (2007) que em seu trabalho não observou alteração do número de eosinófilos em cães infectados por *Babesia* spp.. O aumento do número de eosinófilos apresentado nestes animais pode ter sido ocasionado pela presença de parasitismo intestinal e ectoparasitismo (principalmente pulgas) uma vez que os eosinófilos estão envolvidos na defesa contra parasitas helmínticos, modulação da inflamação, como célula efetora da doença alérgica e na asma, fagocitose, efeito antitumoral, dentre outras funções (Thrall, 2007). Estes achados também corroboram a justificativa da anemia microcítica como sendo ocasionada pela perda de sangue. A linfopenia e linfocitose foi observada em 6,97% e 18,6% dos animais infectados. Estes valores são próximos aos encontrados por Zygmier et al. (2007), que em seus trabalhos com 248 cães observaram linfopenia em 7,2% e linfocitose em 14,9% dos cães infectados por *Babesia* spp.

A maioria dos animais do G1 (62,79%) apresentou trombocitopenia (Tabela 13). Embora a trombocitopenia não tenha sido tão freqüente como a descrita por Zygmier et al. (2007), os resultados corroboram as afirmações referentes a tendência à ocorrência de trombocitopenia em cães com babesiose (Guimarães et al., 2004; Furlanello et al., 2005; Gopegui et al., 2007). Os mecanismos da trombocitopenia na babesiose canina não são suficientemente claros, mas a trombocitopenia tem sido atribuída mais comumente à ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) que pode ter como causas predisponentes hemólise, vasculite, acidose, hipóxia, dentre outros, sendo estas alterações clínicas comuns na babesiose (Campos et al., 2002).

Não foi observado alteração dos níveis séricos das enzimas renais (uréia e creatinina) e hepáticas (ALT, AST e FA) em nenhum dos grupos estudados, mesmo quando analisados individualmente e verificando o efeito local. As alterações hepáticas e renais descritas estão relacionadas à hipóxia ocasionada pela hemólise (Campos et al., 2002), contudo no presente estudo, embora tenha sido observada anemia, esta não foi acentuada e portanto, não comprometeu a função destes órgãos. Podemos ressaltar

apenas, quando analisado as freqüências (Tabela 13), que foi observada diminuição da AST (25,58%) e FA (18,60%) nos animais positivos (G1). Diferindo assim de estudos realizados onde há relatos de aumento dos níveis séricos de uréia, creatinina, elevação da atividade de AST (Scally et al. 2006), aumento da atividade de ALT e FA (Irizarry-Rovira et al. 2001).

A *Babesia canis* causa doença caracterizada em sua forma aguda por anemia hemolítica regenerativa, febre e hemoglobinúria, havendo, na forma severa da enfermidade, queda nos níveis séricos de proteínas e albumina (Furlanello et al. 2005) e hipergamaglobulinemia moderada (Irizarry-Rovira et al. 2001). Na forma branda da doença são encontrados valores séricos normais (Niwetpathomwat et al. 2006). A hipoalbuminemia encontrada nos animais infectados por *Babesia* spp. pode estar relacionada ao fato da albumina ser uma proteína de fase aguda negativa (Leisewitz et al., 2001) e, portanto na presença de processo inflamatório, em que se observa aumento nas concentrações de globulinas, ocorre a hipoalbuminemia (Kaneko, 1997; Cerón et al., 2005). A hipoalbuminemia observada nesses animais pode ter sido acentuada pela deficiência nutricional destes cães, uma vez que estudos realizados por Fuhrman et al. (2004), comparando o aumento das proteínas de fase aguda negativa no desequilíbrio dietético e as doenças, demonstrou que a deficiência nutricional provocam um efeito mais forte sobre as transferrinas e albuminas que em outras proteínas de fase aguda negativa.

Referindo-se as alterações dos níveis séricos de proteínas, foi observado que os grupos G1 (animais positivos apenas para *Babesia* spp.) e G2 (cães infectados e com co-infecções por *Hepatozoon* sp., *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp.) (Tabela 12) foram iguais entre si, mas diferiram estatisticamente do G3 (cães negativos) quando analisados a proteína sérica total, globulina e relação albumina/globulina (A/G). Os grupos G1 e G2 apresentaram maior hiperproteinemia e gamaglobulinemia que o G3. A relação A/G apresentou-se diminuída em todas as análises realizadas, exceto quando analisarmos isoladamente os animais do abrigo do Lago Oeste (Tabela 7), onde esta relação manteve-se dentro dos valores de normalidade para a espécie. Estudos relatam que na infecção por *Babesia* spp. pode ocorrer diminuição dos níveis de albumina, relação A/G e alfa-globulinas (O'Dwyer & Massard, 2002; Furlanello et al., 2005),



concordando assim com os achados deste trabalho. A hiperproteïnemia e gamaglobulinemia apresentada no G3, pode estar relacionada a qualquer outro parasita (inclusive *Leishmania* sp.) e outros agentes, hemólise ocasionada nos processos inflamatórios, bem como outras patologias não detectadas no exame clínico.

Através da técnica da PCR e digestão enzimática, podemos identificar as sub-espécies que infectaram os cães deste estudo. Utilizando os produtos dos oligonucleotídeos PIRO A e PIRO B e realizado a digestão enzimática com as enzimas *Taq I* e *Hinf I*, observamos que duas sub-espécies acometem os cães desta região: *Babesia canis vogeli* - 38 cães (88,37%) e *Babesia canis rossi* – 5 cães (11,63%).

A *Babesia canis vogeli* foi descrita em outros estados do Brasil como: São Paulo (Passos et al., 2005); Rio de Janeiro (Sá et al., 2006), Minas Gerais (Passos et al., 2005; Costa-Júnior et al., 2009) e Goiás (Duarte et al, 2008). A *Babesia canis rossi* é frequentemente identificada na África (Zahler et al., 1998; Carret et al., 1999; Birkenheuer et al., 2003), contudo até o momento não havia relatos no Brasil. A região periurbana de Brasília, é circundada de grandes áreas de reservas naturais, com mata fechada, que possibilita o contato dos cães da região com reservatórios naturais e diversos vetores da babesiose, possibilitando então a infecção dos cães por outras sub-espécies de *Babesias*. Cabe salientar que a identificação das sub-espécies foi feita baseada na digestão enzimática e PCR.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos nas diferentes sub-espécies encontradas. Mas, analisando as freqüências destas variáveis (Tabela 17) podemos destacar que em 25 cães (65,78%) que apresentaram infecção por *B. canis vogeli* apresentaram anemia, sendo que em 11 cães (44%) a anemia foi do tipo anemia microcítica normocrômica. Dos cães infectados com *B. canis rossi*, apenas 1 (20%) apresentou anemia que foi classificada como normocítica hipocrômica. A *B. canis rossi* apesar de ser considerada a mais patogênica das três sub-espécies de *Babesia canis* (Yabsley et al., 2008), neste estudo apresentou-se de forma pouca patogênica, uma vez que poucas alterações foram observadas nos animais quando comparados com os infectados pela *B. canis vogeli*. A baixa patogenicidade da *B. canis rossi* quando comparada com a *B. canis*

*vogeli* pode ser justificada pelo número de cães infectados, que foi muito inferior aos infectados pela *B. canis vogeli*.

A monocitose (Tabela 17) foi o achado do leucograma mais consistente nos cães infectados por *B. canis vogeli* 34 (89,47%) e *B. canis rossi* 3 (60%). É válido ressaltar que a trombocitopenia esteve presente na maioria dos cães infectados por *B. canis vogeli* 23 (60,52%) e *B. canis rossi* 4 (80%).

Os cães infectados pelas duas sub-espécies estudadas apresentaram hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e diminuição da relação A/G (tabela 17). Nos cães infectados por *B. canis rossi* 4 (80%) foi observado hiperproteinemia, hiperglobulinemia e diminuição da razão A/G, enquanto que os infectados por *B. canis vogeli* também apresentaram essas alterações mas em menor proporção.

É importante citar que dos 5 cães que apresentaram infecção por *Babesia canis rossi*, apenas um cão era domiciliado na Fercal e quatro no abrigo do Lago Oeste. Contudo, a proprietária destes animais possui o hábito de levá-los para a fazenda periodicamente. Então, estes animais podem ser expostos a outros vetores e reservatórios naturais da babesiose canina. Por fim, podemos observar que o animal da Fercal com infecção por *Babesia canis rossi* foi o único entre todos os infectados por este agente, que apresentou anemia.

## CONCLUSÕES

Os resultados do estudo realizado nas regiões periurbanas de Brasília, Distrito Federal, nos permite concluir que a babesiose canina ocorre com alta frequência nas regiões periurbanas de Brasília. Duas sub-espécies de *Babesia canis* acometem os cães desta região: *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*.

As principais alterações hematológicas observadas na infecção por *Babesia* spp. foram: anemia microcítica normocrômica, monocitose e trombocitopenia, enquanto que as principais alterações bioquímicas séricas encontradas foram: hiperproteinemia, hipoalbuminemia e diminuição da relação albumina/globulina.

Pode-se observar que as co-infecções com *Hepatozoon sp.*, *Ehrlichia sp.* e *Leishmania sp.* são muito frequentes nos cães da Fercal e Lago Oeste.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N.X., CAMPOS, K.C.H., KOHAYAGAWA, A., ALMOSNY, N.R.P. Enzimologia clínica veterinária. Parte I: fatores que interferem na interpretação dos resultados. **Revista Educação Continuada CRMV-SP**. v.5, n.2, p.150-156, 2002.
- BARIC RAFAJ, J.; MRLJAK, V.; KUCER, N.; BRKLJACIC, M.; MATIJATKO, V. Protein C activity in babesiosis of dogs. **Vet. Arhiv**. v.77, p. 1-8, 2007.
- BIENZLE, D. Monocytes and Macrophages. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ª edição, Cap. 49, pg. 318-325, 2000.
- BIRKENHEUER, A. J., LEVY, M. G., BREITSCHWERDT, E. Development and evaluation of a seminested PCR for detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p. 4172-7, 2003.
- BIRKENHEUER, A.J.; NELL, J.; RUSLANDER, D.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. **Vet. Parasitol**. v.124, p.151-160, 2004.
- BOOZER, A.L. & MACINTIRE, D.K. Canine Babesiosis. **Vet. Clin North Am. Small Anim. Pract.** v.33, p.885-904, 2003.
- BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babésiose canine à *Babesia canis*. **Point Vét.** v.27, p.11-24, 1995.
- CAMPOS, K. C. H.; MACHADO, L. P.; SANTOS, K. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S.; SILVEIRA, V. F.; MATTOSO, C. R. S.. Incidência de trombocitopenia em cães naturalmente infectados por *Babesia canis*. In: 6ª Mostra científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, 2002, Botucatu. **Anais 6ª Mostra científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP**. Botucatu: FMVZ-UNESP/Botucatu. p. 56, 2002.

- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 46, p. 298-303, 1999.
- CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, n.2, p.85-99, 2005.
- COSTA-JÚNIOR, L.M.; RIBEIRO, M.F.; REMBECK, K.; RABELO, E.M.; ZAHLER-RINDER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural áreas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**. v.86, n.2, p.257-260, 2009.
- CRIADO-FORNELIO A.; GONZALEZ-DEL-RIO, M.A.; BULLING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular characterization of *Babesia gibsoni* isolate from Spanish dog. **Vet. Parasitol.** v.117, p.123-129, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. v.83, p. 210-211, 2008.
- [DISCH, J.](#); [MACIEL, F. C.](#); [OLIVEIRA, M. C. DE](#); [ORSINI, M.](#); [RABELLO, A.](#) Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2003.
- DOYLE, C. K. et al. Detection of medically important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-time polymerase chain reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.
- DUARTE, S.C.; LINHARES, G.F.C.; ROMANOWSKI, T.N.; NETO, O.J.S.; BORGES, L.M.F. 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.** v. 152, p.16-20, 2008.

- DUH, D.; TOZON, N.; PETROVEC, M.; STRASEK, K.; AVSIC-ZUPANC, T.  
Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Research**. v.35, p.363-368, 2004.
- FARWELL, G.E.; LEGRAND, E.K.; COBB, C.C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** Schaumburg, v.180, p.507-511, 1982.
- FUHRMAN, P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **J. Am. Diet Assoc.** v.104, p. 1258-1264, 2004.
- FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALEGO, L.  
Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitology**. v.134, p. 77-85, 2005.
- GUELFY, J. F.; CANDEBAT, D. Variations de l' hémogramme en fonction de l' ancienneté des symptômes chez les chiens adultes atteints de babésiose äigue spontanée. **Rev. Med. Vet.** 149, 65-68, 1998.
- 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 (suppl. 1), p.229, 2004.
- GONDIM, L.F.P.; KAHAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A.W.; TAKAHIRA, R.K.; FRANCO, S.R.V. Canine hepatozoonoses in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**. v.74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.
- GOPEGUI, R.R.; PEÑALBA, B.; GOICOA, A.; ESPADA, Y.; FIDALGO, L.E.; ESPINO, L. Clinico-phatological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. **The Veterinary Journal**. 174, p.129-132, 2007.
- HARVEY, J.W. Microcytic Anemias. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphi: Lippincott Williams&Wilkins, p.200-204, 2000.
- HUNFELD K., HILDEBRANDT A., GRAY J., Babesiosis: Recent insights into an ancient disease, **Int. J. Parasitol.** 38:1219–1237, 2008.

- INOKUMA, H. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**. v.106, n.3, p.265-271, 2002.
- IRIZARRY-ROVIRA, A.R.; STEPHENS, J.; CHRISTIAN, J.; KJEMTRUP, A.; DENICOLA, D.B.; WIDMER, W.R.; CONRAD, P.A. *Babesia gibsoni* Infection in a Dog from Indiana. **Veterinary Clinical Pathology**. V.30, n.4, p.180-188, 2001.
- JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- LEISEWITZ, A.L.; JACOBSON, L.S.; DE MORAIS, H.S.; REYERS, F. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.15, p. 445-452, 2001.
- MATJILA, P.T.; PENZHORN, B.L.; BEKKER, C.P.J.; NIJHOF, A.M.; JONGEJAN, F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Vet Parasitol**. v.122, p. 119-125, 2004.
- MIRANDA, F.J.B.; ALBERNAZ, A.P.; JUNIOR, M.O.A.; MACHADO, J.A. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos de Goytacases, RJ. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, n.1, p.238-241, 2008.
- MUNDIM, A.V.; MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; CURY, M.C.; MUNDIM, M.J.S. Clinical and hematological sings associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. And with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.153, p. 3-8, 2008.
- NIWETPATHOMWAT, A.; TECHANGAMSUWAN, S.; SUVARNAVIBHAJA, S. A retrospective study of the clinical hematology and biochemistry of canine ehrlichiosis in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. **Comparative Clinical Patology**. v.14, n.4, 2006.
- O'DWYER, L.H.O. & MASSARD, C.L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses, p.57-67. In: Almosny N.R.P. (Org.).

## **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses.**

L.F. Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, 135p., 2002.

- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLERRINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 81-5, 2005.
- RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Florida: CRC Press Inc., 255p., 1988.
- SÁ, A.G.; CERQUEIRA, A.M.F.; O'DWYER, L.H.; MACIEIRA, D.B.; ABREU, F.S.; FERREIRA, R.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; ALMOSNY, N.R.P. Detection molecular e characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected brasilian dogs. **Intern. J. Appl. Res. Vet. Méd.** v.4, n,2, p. 163-168, 2006.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDITTI, R.B.R.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. In dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal.** v.179, n.1, p.145-148, 2009.
- SCALLY M.P.; LEISEWITZ A.L.; LOBETTI R.G.; THOMPSON P.N. The elevated serum urea:creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. **J. S. Afr. Vet. Assoc.** v.77, n.4, p. 175-178, 2006.
- SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E.; CARCY, B.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T. *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. **Veterinary Parasitology.** v.157, p.211-221, 2008.
- THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed. Roca: São Paulo, p. 335-354, 2007.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.** v.140, p.223-230, 2006.
- UNGAR DE SÁ, M.F.M.; UNGAR DE SÁ, J.E.; BITTENCOURT, D.V.V.; BISPO, A.C.; RÉGIS, A.M.M.; SOUZA FILHO, N.J.; GOMES NETO, C.M.B.; SOUZA,



- B.M.P.S.; BITTENCOURT, T.C.C.; FRANKE, C.R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. **Rev. Bras. Saúde e Prod. An.** V.8, n.3., p.178-183, jul/set, 2007.
- YABSLEY, M.J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C.N.; CATTAN, P.F.; CHERRY, N.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; O'CONNOR, T.; CHANDRASHEKAR, R.; PATERSON, T.; PEREA, M.L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia canis, Hepatozoon canis, Bartonella vinsonii berkhoffii, and Rickettsia spp. In dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*. v.151, p. 279-285, 2008.
- ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol. Res.** v.84, p. 544-548, 1998.
- ZYGNER, W.; RAPACKA, G.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; DLUGOSZ, E.; WEDRYCHOWICZ, H. Biochemical abnormalities in serum of dogs infected with large Babesia in Warsaw (Poland). **Polish Journal of Veterinary Science**. v.10, n.4, p. 245-253, 2007.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A babesiose canina é uma doença endêmica nas regiões periurbanas de Brasília e relevante na clínica médica de pequenos animais, uma vez que a principal forma de transmissão desta doença é através da picada do carrapato.

O presente trabalho demonstrou o quanto a babesiose canina é sub diagnosticada na Medicina Veterinária, devido à técnica de diagnóstico comumente utilizada (pesquisa de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo e borda de orelha).

O advento das técnicas de diagnóstico moleculares permitem aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnóstico que podem ser utilizados como rotina diagnóstica. Contudo mais estudos devem ser realizados para identificação de outras espécies e sub-espécies de *Babesia* que acometem os cães em diversas regiões do Brasil.

Mais estudos devem ser realizados, para a clonagem e seqüenciamento das amostras encontradas de *Babesia canis rossi*, assim como o acompanhamento destes

animais infectados para melhor entendimento das alterações ocasionadas por este parasita.

As alterações hematológicas e bioquímicas apresentadas neste estudo apontam para a necessidade de mais análises, juntamente aos estudos sobre identificação das espécies de ectoparasitas para proporcionar um maior esclarecimento da epidemiologia da babesiose canina.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### **Anexol.1. Publicação em Congresso Nacional – CONBRAVET 2008.**

Vasconcelos, M. F.; Paludo, G.R.; Bittencourt, R.F.; Marçola, T.G.; Firmino, F.deP.; Chiareli, R.A. Frequência de hemoparasitoses de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília - Brasil, Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, 2008.

#### **Anexol.2. Publicação em Congresso Nacional – CONBRAVET 2009**

Marçola, T.G.; Vasconcelos, M. F.; Chiareli, R.A.; Bittencourt, R.F.; Firmino, F. de P.; Scalon, M.C.; Marodin, N.B.; Paludo, G.R. Diagnóstico Molecular de Infecção por *Leishmania* em cães do Distrito Federal. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Porto Seguro, 2009.

#### **Anexol.3. Publicação em Congresso Nacional – CONBRAVET 2009**

Vasconcelos, M. F.; Abraham, M.A.; Colmenero, A.; Bittencourt, R.F.; Ramos, R.R.; Angarten, M.B.O.; Marçola, T.G.; Paludo, G.R. Estudo da Infecção por *Babesia* spp. no Distrito Federal, Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Porto Seguro, 2009.

**Anexol.4. Publicação em Congresso Internacional – ESVCP & ISACP Congress 2008.**

Vasconcelos, M. F.; Bittencourt, R.F., Marçola, T.G.; Silva, L.G.; Ramos, R.R.; Angarten, M.B.O.; Paludo, G.R. Hematological findings from dogs naturally infected with *Babesia* spp in Brasília, Brazil. In: ESVCP & ISACP Congress, Barcelona, 2008.

**Anexol.5. Publicação em Congresso Internacional – ASVCP Congress 2009.**

Vasconcelos, M. F.; Chiaeli, R. A.; Bittencourt, R. F.; Marçola, T. G.; Abraham, M. A.; Colmenero, A.; Botelho, R. G.; Paludo, G. R. Hematological findings and diagnosis of *Babesia* spp. infection in dogs from Distrito Federal, Brazil. In: ASVCP Congress, Monterey, 2009.