

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Aspectos Epidemiológicos da *Babesia canis vogeli* em cães da
Baixada Fluminense, RJ

Joice Aparecida Rezende Vilela

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA *Babesia canis vogeli*
EM CÃES DA BAIXADA FLUMINENSE, RJ**

JOICE APARECIDA REZENDE VILELA

Sob a Orientação do Professor
João Luiz Horacio Faccini

e Co-Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Março de 2012

636.7089098153

V699a

T

Vilela, Joice Aparecida Rezende, 1980-
Aspectos epidemiológicos da Babesia
canis vogeli em cães da Baixada Fluminense,
RJ / Joice Aparecida Rezende Vilela - 2012.
137 f.: il.

Orientador: João Luiz Horacio Faccini.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 86-111.

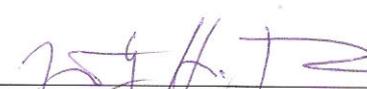
1. Cão - Doenças - Epidemiologia -
Seropédica(RJ)- Teses. 2. Babesiose -
Diagnóstico - Teses. 3. Babesia canis -
Teses. 4. Carrapato como transmissor de
doenças - Teses. I. Faccini, João Luiz
Horacio, 1947-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

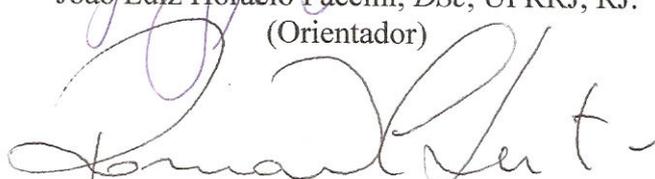
JOICE APARECIDA REZENDE VILELA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

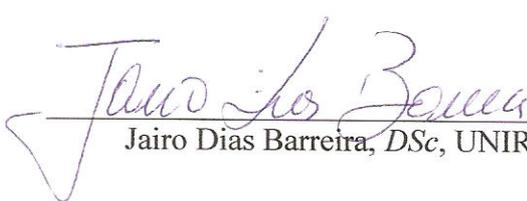
TESE APROVADA EM 30 / 03 / 2012.



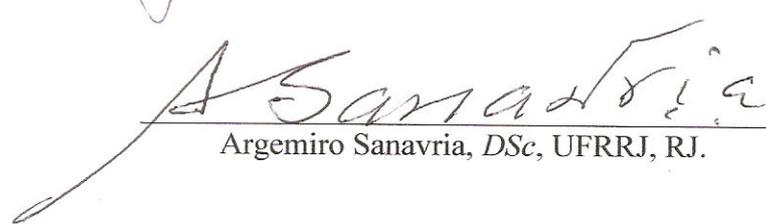
João Luiz Horacio Faccini, *DSc*, UFRRJ, RJ.
(Orientador)



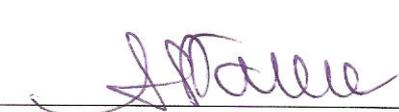
Romário Cerqueira Leite, *DSc*, UFMG, MG.



Jairo Dias Barreira, *DSc*, UNIRIO, RJ.



Argemiro Sanavria, *DSc*, UFRRJ, RJ.



Adivaldo Henrique da Fonseca, *DSc*, UFRRJ, RJ.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra

A Deus, razão da minha existência e que proporcionou a realização deste trabalho;
À UFRRJ, mãe dos mais diversos ensinamentos para minha vida;
Aos animais, grande razão da belíssima ciência que é a Medicina Veterinária, sem os quais
muitos trabalhos não teriam sido realizados em benefício da humanidade;
À sociedade como a grandeza, a qual tenho dever de honrar com meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e permissão de minha caminhada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização de meu Ensino Médio, Graduação e Cursos de Mestrado e Doutorado em Ciências Veterinárias.

A Coordenação de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, que foi essencial nesta jornada.

Aos meus Professores orientadores Dr. João Luiz Horacio Faccini e Dr. Carlos Luiz Massard, pela ajuda, apoio, amizade, incentivos, conselhos e confiança, não se esquecendo de suas famílias que sempre me acolheram nesta jornada.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos conhecimentos transmitidos para minha formação profissional e pessoal.

Aos laboratórios da Estação para pesquisa parasitológica (E.E.P.P.W.O. Neitz do DPA/IV/UFRRJ), pelo apoio nas pesquisas e por ser “nossa casa” durante várias horas do dia.

Aos membros da banca por se dispuserem em meio a tantas tarefas.

Aos meus pais Jorge Martins Vilela e Jane Cristina Rezende Vilela e às minhas irmãs, Josiane Cristina Rezende Vilela e Juliana Rosalina Rezende Vilela pelo apoio e compreensão.

Ao meu namorado Henrique Tenrêra de Souza pelo incentivo, carinho, apoio, amizade e dedicação incondicional durante meus trabalhos na pós-graduação.

Aos meus familiares pela confiança no meu sucesso.

Aos meus amigos da igreja, de trabalho, da vida social e àqueles que passaram por minha vida e deixaram incentivos e lembranças...

Ao Professor Leandro Azevedo Santos e sua equipe, do Departamento de Solos, pela orientação e paciência na realização das reações de PCR em tempo real.

À Professora Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pela amizade, apoio, carinho, orientação e auxílio no diagnóstico sorológico.

À Professora Dr.^a Rosangela Zacarias Machado por me receber com carinho na UNESP Jaboticabal e permitir a realização da prova sorológica.

Ao Professor Dr. Argemiro Sanavria, pelo carinho, amizade, apoio e ajuda durante as coletas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz e demais funcionários do CPGCV e DESP pela ótima convivência e apoio.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, sem os quais este sucesso não seria alcançado: Huarrisson Azevedo Santos, Marcus Sandes Pires, Maristela Péckle Peixoto, Claudia Bezerra da Silva, Aline Falqueto Duarte, Larissa Moraes, Juliana Raimundo, Andressa Guimarães, Allan Felipe Marciano, Larissa Clara da Silva, Pricila Andery, Antonio Tembue, Tiago Marques dos Santos, Érica Cristina Roier e Raquel Cristina por todo incentivo, ajuda sem medida e principalmente pela ótima convivência de trabalho.

À querida amiga Claudia Bezerra da Silva, em especial, por todas as horas que passamos juntas, rindo ou chorando, debaixo de sol e chuva nas coletas...

Em especial aos queridos Marcus Sandes Pires, Maristela Péckle Peixoto e Huarrisson Azevedo Santos pelas importantes considerações e ajuda na escrita da tese.

Aos proprietários e seus cães, muitos dos quais fizemos laços de amizade.

A todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído para este trabalho.

Aos animais, seres inocentes e de verdadeiro amor...

BIOGRAFIA

Joice Aparecida Rezende Vilela, filha de Jorge Martins Vilela e de Jane Cristina Rezende Vilela, natural de Paracambi, RJ, nascida em 8 de abril de 1980. Iniciou sua jornada estudantil aos 5 anos de idade na Escola Municipal Gov. Roberto Silveira concluindo neste, a 4ª série. Da 5ª a 8ª série estudou na Escola Municipal Profª Odete Teixeira da Silva, concluindo o ensino fundamental em 1994. Ingressou em 1995, no Colégio Técnico da UFRRJ, RJ, concluindo o ensino médio técnico em Agropecuária em 1997. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1999 após aprovação em vestibular. Durante a graduação, obteve boas notas, concluindo o curso em 2º lugar geral da turma, em outubro de 2004. Foi aprovada no exame de certificação profissional do CRMV-RJ, no mesmo ano. Ainda, durante a graduação, realizou estágios orientados por professores especialistas nas áreas de clínica médica e cirúrgica de pequenos animais, clínica médica de animais de grande porte, microbiologia, parasitologia e no centro de controle de zoonoses do município de Paracambi, RJ. Realizou concurso com aprovação em monitoria nas áreas de Radiodiagnóstico, Dermatologia clínica e Doenças Parasitárias. Além das monitorias, foi bolsista de Iniciação do CNPq, orientada pelo prof. Dr. Carlos Luiz Massard, quando desenvolveu seus primeiros trabalhos científicos com Protozoários patogênicos e vetores, com ênfase em carrapatos.

Em março de 2006, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV) em nível de mestrado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo bolsista de mestrado do CNPq, orientada pelo Profª Dr. Argemiro Sanavria. Na Pós-graduação obteve ótimos conceitos na maioria das disciplinas concluídas. Em março de 2008 ingressou no Doutorado do CPGCV/UFRRJ sendo contemplada com bolsa concedida pela CAPES, sob a orientação dos Professores Dr. João Luiz Horácio Faccini e Dr. Carlos Luiz Massard.

Participa da linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de Hemoparasitos e Vetores do DPA/IV/UFRRJ. Atualmente faz parte do grupo de pesquisa/CNPq Hemoparasitos de Importância Veterinária, liderado pelo Profª Dr. Carlos Luiz Massard. Atua ativamente nas atividades laboratoriais e auxilia na execução de projetos de pesquisa com carrapatos e hemoparasitos, biologia de vetores, leciona aulas teóricas das disciplinas de Hemoprotozoários de Importância Veterinária e Agentes Patogênicos Transmitidos por Artrópodes (ambas da Pós-Graduação) e teórico-práticas na disciplina de Doenças Parasitárias (da Graduação).

Tem participado de diversos Congressos Nacionais e Internacionais em Parasitologia Veterinária apresentando inúmeros trabalhos científicos. O mais recente deles foi objeto desta tese, escolhido para apresentação sob a forma oral em plenária no Congresso Mundial para Avanços da Parasitologia Veterinária, realizado em Buenos Aires, Argentina, em Agosto de 2011.

Na vida profissional, em 2005 trabalhou como Médica Veterinária na Secretaria Municipal de Agricultura de Paracambi, RJ e exerceu a prática Clínico-Veterinária de Pequenos Animais. É voluntária em projetos de ensino, relacionados à Segurança, Meio Ambiente e Saúde, desde 2006, ministrando palestras a trabalhadores e estudantes, com temas relacionados à prevenção de acidentes com animais peçonhentos e doenças transmissíveis de aspectos zoonóticos. Em março de 2011 foi admitida em concurso público para o cargo de médica veterinária no centro de Vigilância em Saúde do município de Vassouras, RJ, atuando na Vigilância Ambiental e Vigilância Sanitária até a presente data, com ciência do CPGCV/UFRRJ e da CAPES.

RESUMO

VILELA, Joice Aparecida Rezende. **Aspectos Epidemiológicos da *Babesia canis vogeli* em cães da Baixada Fluminense, RJ.** 2012. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A babesiose canina, patologia de ampla distribuição no Brasil e no mundo, é causada por protozoários do gênero *Babesia* spp., que parasitam hemácias e são transmitidos por carrapatos Ixodidae. O presente trabalho objetivou determinar a epidemiologia da babesiose canina através de aplicação de questionários e diagnóstico por ELISA, diagnóstico por microscopia direta, diagnóstico de *Babesia canis* por meio da PCR em tempo real, identificação das subespécies de *B. canis* por meio da RFLP, caracterização das principais alterações hematológicas, identificação dos ectoparasitos e diagnóstico através da PCR em tempo real do agente da babesiose canina em carrapatos de cães do município de Seropédica, Baixada Fluminense - RJ. No presente estudo foram avaliados 311 cães, sendo 167 (n=53,7%) de área rural e 144 (n=46,3%) de área urbana. Através do teste de ELISA, encontrou-se um total de 39 cães (12,54%) sorologicamente positivos para *Babesia canis*, com frequência de 21,56% (n=36/167) nos cães de área rural e 2,08% (n=3/144) nos cães de área urbana, sendo, portanto a área rural, a de maior soropositividade ($p < 0,0001$). As variáveis que apresentaram associação com a soropositividade foram: área de domicílio do cão, definição racial, idade, infestação por carrapatos, locais de acesso do cão, contato com outros animais, hábito do animal, ambiente do cão, ausência de limpeza do ambiente, ausência de assistência veterinária, ausência de abrigo e origem errante. O perfil do proprietário e o manejo do cão apresentaram características marcantes no parasitismo por carrapatos e conseqüentemente na frequência de soropositividade para o agente. O diagnóstico pela PCR em tempo real de amostras sanguíneas de cães revelou uma frequência de 11,90% (n=37/311). A subespécie identificada acometendo cães desta região foi *B. canis vogeli*. Do total de 311 cães avaliados, foram observadas infestações por ectoparasitos em 252 (81,03%) cães. Destes, 70,64% (n=178/252) apresentaram-se infestados por carrapatos. Em relação à infestação por carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus* foi encontrado em 68,54% (n=122/178) dos cães, *Amblyomma cajennense* em 11,80% (n=21/178), *A. ovale* em 3,37% (n=6/178) e *A. dubitatum* em 0,56% (n=1/178) dos cães infestados por carrapatos. Ninfas de *R. sanguineus* e *Amblyomma* sp. foram observadas em 13,48% (n=24/178) e 5,62% (n=10/178) dos cães infestados por carrapatos, respectivamente. A espécie de carrapato mais frequente nos meios urbano e rural foi *R. sanguineus*, que apresentou associação com a positividade de *B. canis vogeli* nos cães pelo método molecular. A frequência de carrapatos positivos para *B. canis* foi de 5% (n=12/240). O DNA de *B. canis* foi detectado em nove carrapatos adultos de *R. sanguineus*, em um adulto de *A. cajennense* e em duas ninfas de *Amblyomma* sp.. As principais alterações hematológicas nos cães infectados foram: anemia, hemoglobinemia e trombocitopenia. O estudo permitiu concluir que a babesiose canina causada por *B. canis vogeli* ocorre nas áreas rurais e urbanas do município estudado sendo de grande importância a sua ocorrência nos municípios da Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, os quais apresentam características semelhantes de expansão da urbanização para o meio rural com pequena distinção entre as duas áreas e aponta para a importância do diagnóstico do patógeno e identificação de vetores nos cães, visando o conhecimento das condições epidemiológicas para a adoção de medidas profiláticas adequadas, pois além de afetarem a sanidade animal muitos destes vetores são capazes de veicularem patógenos transmissíveis ao homem.

Palavras-chave: *Babesia canis vogeli*, Carrapatos, Diagnóstico.

ABSTRACT

VILELA, Joice Aparecida Rezende. Epidemiological Aspects of *Babesia canis vogeli* in dogs from Baixada Fluminense, RJ. 2012. 121p. Thesis (Doctor in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The canine babesiosis, is a disease widely distributed in Brazil and worldwide, caused by protozoa of the genus *Babesia* spp. that parasitize erythrocytes and it's transmitted by ticks Ixodidae. This study aimed to characterize the epidemiology of canine babesiosis through questionnaires and serological diagnosis by ELISA, diagnosis of *Babesia* spp. infection in dogs by real-time PCR technique, identify the subspecies of *B. canis* by RFLP, characterize the hematological aspects, diagnosis by direct microscopy, identification of ectoparasites and diagnosis by real-time PCR, the agent of canine babesiosis in ticks from dogs from rural and urban areas from Seropédica city, RJ State. The present study evaluated 311 dogs, 167 (n=53,7%) of rural and 144 (n=46,3%) in urban areas. By ELISA technique, was found 39 dogs (12,54%) serologically positive for *Babesia canis*, with frequency of seropositivity of 21,56% (n=36/167) in dogs of rural area and 2,08% (n=3/144) in dogs from urban area, and therefore the rural area, the highest seropositivity (p<0,0001). The variables associated with seropositivity were: area of residence of the dog, breed, age, presence of ticks, environment of dog access, contact with other animals, the animal's habits, condition of cleanliness of the environment, absence of veterinary care and animal wandering. The profile of the owner and its management were striking features in parasitism by ticks and consequently the frequency of seropositivity to the agent. The diagnostic by PCR real- time of blood samples from dogs showed a frequency of 11,90% (n=37/311). The subspecies identified affecting dogs of this region was *B. canis vogeli*. Of the total of 311 dogs evaluated, infestations by ectoparasites were found in 252 (81,03%) dogs at the time of collection. Of these, 70,64% (n=178/252) were infested with ticks. In relation to the infestation, *Rhipicephalus sanguineus* was found in 68,54% (n=122/178) of the dogs, *Amblyomma cajennense* in 11,80% (n=21/178), *A. ovale* in 3,37% (n=6/178) and *A. dubitatum* in 0,56% (n=1/178). Nymphs of *R. sanguineus* and *Amblyomma* sp. were observed in 13,48% (n=24/178) and 5,62% (n=10/178) of dogs infected with ticks, respectively. The tick species most common in urban and rural areas was *R. sanguineus*, which was associated with positivity of *B. canis* in dogs by molecular method. The frequency of ticks positive for *B. canis* was 5% (n=12/240). The DNA from *B. canis* was detected in nine *R. sanguineus* ticks, an *A. cajennense* adult and two nymphs of *Amblyomma* sp. The main hematological changes in infected dogs were: anemia, thrombocytopenia and hemoglobinemia. The study concluded that canine babesiosis caused by *B. canis vogeli* occurs in rural and urban areas from the Seropédica being of great importance its occurrence in the cities of the Rio de Janeiro State, which have characteristics similar expansion of urbanization to rural areas with little distinction between the two areas and points to the importance of diagnosis and identification of the pathogen and vectors in dogs, in order to know the epidemiological conditions for the adoption of appropriate preventive measures, because in addition to affect the animal health, many of these vectors are capable to transmit pathogens to humans.

Key words: *Babesia canis vogeli*, Ticks, Diagnostic.

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Prevalência de <i>Babesia canis</i> no Brasil no período de 1990 a 2004 de acordo com a procedência das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado.	4
Quadro 2. Resultados esperados dos tamanhos dos fragmentos de DNA (em pb) na PCR e restrição enzimática utilizando as enzimas <i>Taq I</i> e <i>Hinf I</i> .	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localização geográfica do município de Seropédica, Rio de Janeiro, evidenciando os bairros e as principais rodovias federais e estaduais existentes, e o Arco Viário que está sendo implementado na região.	30
Figura 2. Trofozoítas de <i>Babesia canis</i> em eritrócitos de cão, esfregaço sanguíneo corado pelo método de Giemsa diagnosticado por microscopia óptica. Cães de Seropédica, RJ, Brasil.	37
Figura 3. Percentual de espécimes de ectoparasitos em cães infestados (n=252) de áreas rurais e urbanas no município de Seropédica, RJ.	38
Figura 4. Frequência de cães infestados por carrapatos (n=178) de áreas rurais e urbanas no município de Seropédica, RJ.	39
Figura 5. Frequência de infestação por ectoparasitos (n=311) em cães de áreas rurais e urbanas no município de Seropédica, RJ.	39
Figura 6. Curva de dissociação (<i>Melting Curve</i>) do fragmento de 71pb do gene <i>18S rRNA</i> do controle positivo e das amostras de cães positivas mostrando a especificidade de amplificação de <i>Babesia</i> sp. pela PCR em tempo real.	51
Figura 7. Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 71 pares de base do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Babesia</i> sp. O valor de C_T obtido pela PCR em tempo real foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo utilizando o sistema SYBR green.	52
Figura 8. Sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green para a detecção de amplificação. A curva mostra amplificação de diluições seriadas (1 – 100.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 71 pares de base do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Babesia</i> sp.	53
Figura 9. Visualização da amplificação com os pares de “primers” PIRO A e PIRO B após ser submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. Fragmentos com cerca de 480 pb.	54
Figura 10. Visualização da digestão enzimática com <i>TAQI</i> . A digestão com <i>TaqI</i> apresentou separação em dois fragmentos com aproximadamente 200pb e 280pb, compatíveis com a subespécie <i>Babesia canis vogeli</i> . Nesta digestão foi visualizado também fragmento com tamanho em torno de 500 pb, compatível com <i>Hepatozoon</i> sp.	55
Figura 11. Visualização da digestão enzimática com <i>HinfI</i> . Neste processo também foram observados fragmentos com aproximadamente 500pb. Nas ultimas três amostras, foi verificado um padrão de digestão não compatível para esta enzima.	55

- Figura 12.** Frequência de cães com alterações no número de eritrócitos, no valor do hematócrito, na concentração de hemoglobina plasmática e número de plaquetas em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. 57
- Figura 13.** Frequência de cães com alterações nos índices hematimétricos (hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio, volume plaquetário médio, amplitude de distribuição das hemácias) e sólidos totais plasmáticos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. 58
- Figura 14.** Frequência de cães com alterações na leucometria global, número absoluto de linfócitos, neutrófilos em bastão, neutrófilos segmentados, monócitos e eosinófilos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. 60
- Figura 15.** Frequência de carrapatos em cães positivos para *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ. 61
- Figura 16.** Frequência das diferentes espécies de carrapatos em cães positivos e negativos para *Babesia canis* no município de Seropédica, pela PCR em tempo real. 62

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência de infestação por carrapatos em cães do município de Seropédica, RJ em função de características inerentes à estação do ano.	40
Tabela 2. Grau de infestação por carrapatos em cães do município de Seropédica, RJ em função de características inerentes à estação do ano.	40
Tabela 3. Frequência de cães positivos para <i>Babesia canis</i> no município de Seropédica, RJ, diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função de características inerentes à estação do ano.	41
Tabela 4. Frequência de cães positivos para <i>Babesia canis</i> diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função de características inerentes ao animal.	42
Tabela 5. Frequência de cães positivos para <i>Babesia canis</i> diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função das características inerentes ao comportamento, hábito e manejo do cão.	44
Tabela 6. Frequência de cães positivos para <i>Babesia canis</i> diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função dos aspectos clínicos do cão.	46
Tabela 7. Características das propriedades localizadas no município de Seropédica, RJ, relacionadas ao estudo sorológico de cães para <i>Babesia canis</i> no município de Seropédica, RJ.	47
Tabela 8. Percepção dos proprietários, orientação clínica, condição econômica, formas de limpeza utilizadas no local onde permanece o animal e medidas de controle adotadas para infestação por carrapatos, relacionadas ao estudo de <i>Babesia canis</i> no município de Seropédica, RJ.	49
Tabela 9. Percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais, relacionados ao estudo de <i>Babesia canis</i> no município de Seropédica, RJ.	50
Tabela 10. Eritrograma e sólidos totais de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Babesia canis</i> em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro.	56
Tabela 11. Leucograma de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Babesia canis</i> . Cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro.	59
Tabela 12. Grau de infestação por carrapatos e diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> através da PCR em tempo real.	62
Tabela 13. Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> através da técnica de PCR em tempo real em carrapatos e em cães.	63

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	base púrica Adenina
C	base pirimídica Citosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dot-ELISA	do inglês “dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
G	base púrica Guanina
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mM	Milimolar
pb	pares de bases
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pH	potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
rDNA	ácido desoxirribonucleico ribossômico
RFLP	do inglês “Restriction fragment length polymorphism”
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
rpm	rotações por minuto
T	base pirimídica Timina
Taq	enzima DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade
V	Volts
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
18S rRNA	porção 18S do RNA ribossômico
®	Marca Registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 O cão na Sociedade.....	03
2.2 Importância das Doenças Transmitidas por carrapatos.....	03
2.3 Breve Histórico da Babesiose.....	05
2.4 Nomenclatura e Classificação Taxonômica.....	06
2.5 Aspectos Epidemiológicos.....	06
2.5.1 Espécies de <i>Babesia</i> spp. que infectam cães.....	06
2.5.2 Vetores, reservatórios e formas de transmissão.....	07
2.5.3 Distribuição geográfica.....	09
2.5.4 Fatores relacionados à babesiose canina.....	10
2.5.5 Fatores relacionados à presença de carrapatos.....	13
2.6 Aspectos Imunológicos.....	15
2.7 Manifestações Clínicas, Patogenia e Achados Anatomopatológicos.....	16
2.8 Achados Laboratoriais.....	18
2.8.1 Hematológicos	18
2.8.2 Bioquímicos	19
2.9 Métodos de Diagnóstico e suas Vantagens e Desvantagens	20
2.9.1 Diagnóstico microscópico	20
2.9.2 Diagnóstico sorológico.....	21
2.9.3 Diagnóstico molecular	22
2.9.4 Diagnóstico molecular em vetores.....	24
2.9.3 Diagnóstico diferencial	25
2.10 Tratamento e Profilaxia da Babesiose Canina	27
2.11 Saúde Pública	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Descrição da Região Estudada.....	30
3.2 Inquérito Canino	31
3.2.1 Tamanho da amostra e amostragem	31
3.2.2 Visita às residências e aplicação do questionário epidemiológico.....	31
3.2.3 Coleta de material biológico (sangue) e ectoparasitos dos cães.....	32
3.2.4 Local de realização das análises laboratoriais.....	32
3.3 Avaliação Hematológica.....	33
3.4 Avaliação Parasitológica através de Esfregaço Sanguíneo.....	33
3.5 Identificação dos Ectoparasitos Coletados.....	33
3.6 Análise Sorológica.....	33
3.7 Extração de DNA de Amostras de Sangue Total e Carrapatos	34
3.7.1 Quantificação e pureza das amostras de DNA.....	34
3.7.2 Obtenção dos controles positivos	34
3.8 PCR em Tempo Real das Amostras de DNA de Sangue de Cães e Carrapatos para Diagnóstico de <i>Babesia</i> spp.....	34
3.8.1 Sensibilidade e especificidade analítica da PCR utilizando o sistema SYBR Green para detecção da amplificação de <i>Babesia</i> spp.	35
3.8.2 Medidas para verificação de contaminações nas reações.....	35

3.9 PCR-RFLP para Diferenciação das Três Subespécies de <i>Babesia canis</i> (<i>Babesia canis canis</i> , <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Babesia canis rossi</i>).....	35
3.10 Análise Estatística.....	36
3.11 Princípios Éticos.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Aspectos Epidemiológicos de <i>Babesia canis</i> em Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.....	37
4.1.1 Diagnóstico pela técnica direta de esfregaço sanguíneo a partir de amostras sanguíneas de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.....	37
4.1.2 Avaliação do ectoparasitismo em cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.....	37
4.1.3 Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> através de diagnóstico indireto pela técnica sorológica de ELISA (Ensaio Imunoenzimático de Adsorção) a partir de amostras séricas de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.....	40
4.1.4 Fatores associados com o resultado positivo através de diagnóstico pelo método sorológico de ELISA para <i>Babesia canis</i> em cães domésticos.....	41
4.1.5 Fatores associados às características dos cães domésticos com diagnóstico positivo pelo método sorológico de ELISA para <i>Babesia canis</i>	41
4.1.6 Fatores associados ao comportamento, hábito e manejo dos cães com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> pelo método sorológico de ELISA.....	43
4.1.7 Fatores associados aos aspectos clínicos dos cães com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> pelo método sorológico de ELISA.....	45
4.1.8 Características das propriedades visitadas.....	47
4.1.9 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção e perfil dos proprietários.....	48
4.1.10 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais.....	49
4.2. Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real a partir de Amostras Sanguíneas de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.....	51
4.2.1 Sensibilidade da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico de <i>Babesia</i> spp.....	51
4.2.2 Diagnóstico de subespécies de <i>Babesia canis</i> pela técnica de RFLP a partir de DNA amplificado pela PCR em tempo real de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.....	53
4.2.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos cães com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> pela técnica de PCR em tempo real.....	55
4.2.4 Avaliação do ectoparasitismo em cães e associação com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> em amostras sanguíneas de cães através da PCR em tempo real....	61
4.3 Diagnóstico de <i>Babesia</i> pela Técnica de PCR em Tempo real em Amostras de Carrapatos de Cães do Município de Seropédica, RJ.....	63
4.4 Comparação entre as Frequências de Resultados pelos Métodos de Esfregaço Sanguíneo, Sorológico por ELISA e PCR em Tempo Real.....	63
5 DISCUSSÃO	64
5.1 Avaliação do Ectoparasitismo em Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.....	64

5.2 Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> através do Método Indireto pela Técnica Sorológica de ELISA (Ensaio Imunoenzimático de Adsorção) a partir de Amostras Séricas de Cães do Município de Seropédica, RJ.....	68
5.2.1 Fatores associados às características dos cães com diagnóstico positivo pelo método sorológico de ELISA para <i>Babesia canis</i>	69
5.2.2 Fatores associados ao comportamento, hábito e manejo dos cães com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> pelo método sorológico de ELISA.....	71
5.2.3 Fatores associados aos aspectos clínicos dos cães com diagnóstico positivo para <i>Babesia canis</i> pelo método sorológico de ELISA.....	73
5.2.4 Características das propriedades visitadas.....	74
5.2.5 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção e perfil dos proprietários.....	75
5.2.6 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais.....	77
5.3 Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real a partir de Amostras Sanguíneas de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.....	77
5.3.1 Diagnóstico de subespécies de <i>Babesia canis</i> pela técnica de RFLP a partir de DNA amplificado pela PCR em tempo real de amostras sanguíneas de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.....	78
5.4 Comparações de Resultados pelos Métodos de Esfregaço Sanguíneo, Sorológico por ELISA e PCR em Tempo Real.....	79
5.5 Avaliação do Ectoparasitismo em Cães e Associação com Diagnóstico Positivo para <i>Babesia canis</i> em Amostras Sanguíneas de Cães através da PCR em Tempo Real.....	80
5.6 Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real em Amostras de Carrapatos de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.....	81
5.7 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Cães com Diagnóstico Positivo para <i>B. canis</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real.....	82
6 CONCLUSÃO.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
8 ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

Diversos artrópodes hematófagos vivem como ectoparasitos em cães, podendo exercer o hematofagismo em todas as fases do ciclo, sendo, portanto, considerados importantes parasitos e vetores de agentes patogênicos. Dentre os de maior importância médico-veterinária destacam-se os carrapatos ixodídeos por causarem doenças nos animais pela espoliação direta e pela transmissão de microrganismos, que no homem pode ocorrer acidentalmente, quando os carrapatos se alimentam neste hospedeiro.

Alguns fatores favorecem o aparecimento das hemoparasitoses e carrapatos nos cães, tais como: diversidade de espécies de vetores, proximidade de animais silvestres, além das condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de carrapatos, diretamente relacionadas à grande diversidade de ecossistemas no Brasil. A intensa atividade agrossilvopastoril no Brasil, o estreito convívio do homem com os animais e a valorização de atividades ao ar livre favorecem a disseminação de agentes patogênicos transmitidos por carrapatos.

Muitas espécies de carrapatos podem albergar mais de um agente patogênico por vários meses e até anos, tornando assim, além de vetor, um reservatório e amplificador natural. Os cães, em especial no meio rural, são parasitados por diversas espécies de carrapatos, as quais estão diretamente integradas aos ambientes onde vivem o hospedeiro. O deslocamento dos cães promovido pelos passeios com seus proprietários e o crescimento do mercado interestadual e internacional de cães também favorece a introdução de ectoparasitos anteriormente não identificados em determinada região.

A babesiose canina, tema desta tese, é uma hemoparasitose mundialmente distribuída, endêmica no território brasileiro, causada por protozoários do gênero *Babesia*, sendo o *Rhipicephalus sanguineus*, considerado o seu principal vetor em vários países do mundo. A patogenia desta hemoparasitose está relacionada com a ação hemolítica intra e extravascular, levando à anemia, hemoglobinemia e em sua maioria, hemoglobinúria. Além disso, a variação clínica pode ser classificada entre leve a severa ou de hiperaguda a subclínica. A prevalência desta hemoparasitose e a sua patogenia estão diretamente relacionadas à imunidade do hospedeiro, faixa etária, ambiente que o animal vive, tipo de manejo adotado, e se outras enfermidades ocorrem concomitantemente.

O diagnóstico deste gênero baseia-se geralmente em sinais clínicos, achados hematológicos, observação direta por meio de exame microscópico de esfregaços sanguíneos e na detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos. Entretanto, alguns pesquisadores têm considerado estes métodos imprecisos, devido à variação na parasitemia e à semelhança tanto morfológica como de sinais clínicos na patologia, principalmente em co-infecções e à ocorrência de reações sorológicas cruzadas.

Os métodos de diagnósticos moleculares são importantes ferramentas para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias. No Brasil, a PCR é utilizada com maior frequência na pesquisa e sua utilidade para o diagnóstico de infecções simples e coinfeções por hemoparasitos em cães deve ser avaliada, por ser considerada um dos métodos de diagnóstico de maior sensibilidade, especificidade e rapidez. Apesar disto, esta técnica ainda não é tão difundida na rotina do diagnóstico do clínico, pois poucos laboratórios são equipados para a realização da técnica, pois requer aparelhos, reagentes e mão-de-obra especializada, aumentando os custos para a realização da mesma. Outras variações da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como a nested PCR, seminested PCR, PCR combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), PCR multiplex e PCR em tempo real. Aliado a essas técnicas, o sequenciamento genético permite um grande número de

comparações filogenéticas moleculares de espécies, permitindo importantes conclusões científicas acerca da origem e evolução das espécies.

Em relação ao vetor da babesiose canina no Brasil, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* predomina nas áreas urbanas, pois a disponibilidade de habitats para as fases de vida livre é abundante, uma vez que esse carrapato tem por hábito penetrar em frestas, em superfícies de cimento ou madeira, escalar paredes de alvenaria lisas e ásperas, entre outras. Nas áreas rurais essa disponibilidade é limitada, ficando concentrada às instalações feitas pelo homem, onde os cães soltos tendem a passar algumas horas do dia, contribuindo para a manutenção de populações de *R. sanguineus* nas áreas rurais.

As áreas rurais da região metropolitana do Rio de Janeiro apresentam peculiaridades sócio-econômicas e demográficas que as designam como áreas de transição, pois apresentam grande expansão da cidade para as áreas rurais, propiciando pequena extensão entre as duas áreas e influenciando no constante deslocamento de cães e seus ectoparasitos e patógenos entre estas áreas rurais e urbanas.

O desconhecimento das prevalências de carrapatos e hemoparasitos em cães entre os meios urbano e rural, aliados à falta de conhecimento relacionada à saúde pública justificam a execução deste trabalho no município de Seropédica, considerado uma cidade universitária pela presença da Universidade Federal **Rural** do Rio de Janeiro, que abriga profissionais e estudantes de diferentes estados da federação e outros países. Com a instalação de moradias estudantis neste município, muitos estudantes trazem seus animais, que passam a residir na cidade. O aumento da população canina no município está relacionado à moradia estudantil e ao abandono dos animais com a intenção de que sejam adotados, principalmente pela existência do curso de Medicina Veterinária e seu hospital veterinário no campus.

O conhecimento dos fatores associados à ocorrência de uma determinada hemoparasitose nas áreas rurais e urbanas, o diagnóstico molecular e o levantamento da fauna ectoparasitária poderão contribuir na facilidade do diagnóstico clínico e diferencial das doenças que podem estar ocorrendo nessas áreas. Além disso, servirá de base para a adoção de medidas profiláticas das hemoparasitoses e o controle estratégico da população de carrapatos transmissores de agentes patogênicos para os cães e para o homem, permitindo também a conscientização da população e contribuir assim, com a vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por carrapatos no município estudado, em especial nas áreas rurais.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Identificar o ectoparasitismo em cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ;
2. Realizar o diagnóstico parasitológico de hemoparasitos através de esfregaço sanguíneo de amostras provenientes de cães do município de Seropédica, RJ;
3. Determinar a frequência de anticorpos anti-*Babesia* spp. em cães e a frequência das espécies de carrapatos encontradas nas diferentes áreas;
4. Avaliar os aspectos epidemiológicos da babesiose canina na população de cães das diferentes áreas;
5. Avaliar através de diagnóstico molecular os espécimes de carrapatos encontrados nos cães quanto à presença de hemoparasitos do gênero *Babesia*;
6. Avaliar através de diagnóstico molecular as amostras sanguíneas dos cães, distinguindo-se a subespécie de *Babesia canis* envolvida;
7. Realizar avaliação clínica e hematológica dos cães estudados e correlacionar com o diagnóstico da hemoparasitose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cão na Sociedade

O mercado pet brasileiro teve um crescimento médio de 20% ao ano desde 1990, com uma movimentação de 11,26 bilhões em 2011, segundo a AnfalPet (2012) – (Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação). Nos últimos anos houve um aumento de 17,6% no número de cães e gatos no Brasil, sendo o segundo país do mundo com maior população de animais domésticos, perdendo somente para os Estados Unidos: são 27,9 milhões de cães, 12 milhões de gatos e 4 milhões de outros pets. A relação é de um cão para cada seis habitantes (ANFALPET, 2009). Segundo estimativas do IBOPE (2009) (Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística), cerca de 70% dos domicílios têm algum animal de estimação, sendo que em 54% deles há pelo menos um cachorro. Estas estatísticas demonstram a importância que os animais de estimação vêm adquirindo nos últimos anos dentro dos lares brasileiros, onde muitos são tratados como um membro da família, seja como animal de companhia, no entretenimento, na terapia psíquica de pessoas doentes, como guias, na segurança, no resgate, na busca de entorpecentes, entre outros, justificando a importância e participação do médico veterinário em pesquisas a fim de que melhores condições sanitárias sejam adotadas a fim de diminuir os riscos aos quais o homem e os animais estão expostos.

2.2 Importância das Doenças Transmitidas por Carrapatos

Nas últimas décadas, as doenças causadas por agentes transmitidos por carrapatos têm ganhado maior importância devido ao crescente deslocamento de animais de estimação e ao fato de algumas espécies de carrapatos estarem encontrando nichos em diferentes condições climáticas (SHAW et al., 2001). Outro fato importante, é que uma mesma espécie de carrapato pode ser vetora de vários patógenos e a coinfeção em um único carrapato pode ocorrer (SCHOULS et al., 1999).

As hemoparasitoses constituem um amplo grupo de parasitos que afetam os animais domésticos e silvestres e incluem vários gêneros dentre eles: *Ehrlichia*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Borrelia*, *Rickettsia* e *Mycoplasma*. As infecções por estes hemoparasitos assumem importância na saúde animal por ocasionarem patologias variadas, podendo inclusive levar à morte (LISBÔA, 2010).

Diante de mudanças no estilo de vida, o cão tem um contato cada vez maior com o homem, expondo este, aos agentes comuns entre as duas espécies. Vale ressaltar que o *R. sanguineus* é o vetor para humanos na Europa da *Rickettsia conori*, agente da febre botonosa (MERLE et al., 1998) e vetor em potencial da *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa no Brasil (ROZENTAL et al., 2002, CUNHA et al., 2009) e da borreliose Lyme símile no Brasil (YOSHINARI et al., 1997).

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

No Brasil os principais hemoparasitos de cães são *Babesia canis* Piana & Galli-Valerio, 1895, *Ehrlichia canis* Donatien & Lestoquard, 1935, *Anaplasma platys* Harvey et al, 1978, *Hepatozoon canis* James, 1905 e *Mycoplasma haemocanis* Kikuth, 1928. A transmissão destes parasitos ocorre principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806, sendo este o principal carrapato encontrado em cães de zona urbana (RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA; PEREIRA, 2001; SHAW et al., 2001).

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

A babesiose acomete espécies domésticas, silvestres e o homem (BOOZER; MACINTIRE, 2003; RIOS et al., 2003), sendo atualmente considerada uma zoonose (OLICHESKI, 2003). Entre as doenças transmitidas por carrapatos em cães a babesiose canina destaca-se por sua distribuição mundial (SÁ et al., 2006). No Brasil, a doença é de grande importância veterinária (DANTAS-TORRES, 2008) por seu caráter endêmico em todo o país e prevalência crescente em certas áreas (BASTOS et al., 2004), o que está associado à alta incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* (VIDOTTO; TRAPP, 2004), cuja prevalência e intensidade de infestação vêm aumentando em cães do país (LABRUNA, 2004). Alguns dados relacionados à frequência de babesiose canina no Brasil podem ser verificados no Quadro 1.

Quadro 1. Prevalência de babesiose canina no Brasil no período de 1990 a 2004 de acordo com a procedência das amostras estudadas e métodos de diagnóstico utilizados em diferentes grupos de pesquisa (Adaptado por COSTA-JUNIOR, 2007).

Prevalência (%)	Descrição dos animais estudados e localização	Método de Diagnóstico	Referência
0,34	Hemogramas de cães de zona urbana de Uberlândia - MG	ES	Santos et al., 2004
1,28	Prontuários de laboratório de Cuiabá - MT	ES	Moura et al., 2002
1,47	Cães de Campos dos Goytacazes - RJ	ES	Miranda et al., 2006
1,98*	Cães de áreas rurais de Juiz de Fora - MG	ES	Rodrigues et al., 2004
2,00*	Cães de áreas rurais do estado de São Paulo	ES	Lopes et al., 2006
2,00	Cães domiciliados em Juiz de Fora - MG	ES	Soares et al., 2006
2,50	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	ES	Bicalho et al., 2004
2,76	Cães atendidos no hospital veterinário da UFRPE, Recife - PE	ES	Lima et al., 2006
4,00	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	ES	Spiewak, 1992
5,20*	Cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro	ES	O'Dwyer, 2000
8,00	Cães de clínicas e domiciliados nos município de Ilhéus e Itabuna-BA	ES	Carlos et al., 2006
10,30	Cães de rua de São Paulo - SP	ES	Dell-Porto et al., 1993
10,38	Cães de rua de São Paulo - SP	ES	Dell-Porto et al., 1990
14,00	Cães de rua do Rio de Janeiro - RJ	ES	Paraense & Viana, 1949
18,11	Cães domiciliados no município de Campos - RJ	ES	Almeida et al., 2002
20,75	Cães capturados no município de Teresópolis - RJ	ES	Cardoso & Serra-Freire, 2001
22,71	Cães apreendidos pelo CCZ de Campos-RJ	ES	Almeida et al., 2002
24,70	Cães capturados no município de Silva Jardim - RJ	ES	Cardoso & Serra-Freire, 2001
26,92	Cães de rua de Juiz de Fora - MG	ES	Rodrigues et al., 2002
34,26	Cães de rua de Campos dos Goytacazes - RJ	ES	Almeida et al., 2006
41,39	Cães domiciliados de Campos dos Goytacazes - RJ	ES	Almeida et al., 2006
42,00	Estudo retrospectivo dos casos suspeitos de hemoparasitoses de Belo Horizonte	ES	Bastos et al., 2004
46,00	Cães com suspeitas de hemoparasitos da zona oeste do Rio de Janeiro - RJ	ES	Massad et al., 2006
18,80	Cães da cidade de Porteirinha - MG	RIFI	Maia et al., 2007
31,20	Cães da cidade de Porteirinha - MG (outubro/2003)	RIFI	Maia et al., 2004
34,10	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	RIFI	Spiewak, 1992
35,70	Cães atendidos em clínicas de Londrina - PR	RIFI	Trapp et al., 2006
41,10*	Cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro	RIFI	O'Dwyer, 2000

Quadro 1. Continuação.

42,40	Cães de rua de São Paulo - SP	RIFI	Dell-Porto et al., 1993
42,45	Cães de rua de São Paulo - SP	RIFI	Dell-Porto et al., 1990
53,20	Cães com suspeitas de hemoparasitos	RIFI	Diniz et al., 2004
60,50	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte – MG	RIFI	Bicalho et al., 2001
66,90	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte – MG	RIFI	Ribeiro et al., 1990
73,00	Cães oriundos da campanha de vacinação anti-rábica de Jaboticabal - SP	RIFI	Furuta et al., 2004
78,40	Cães apreendidos pelo CCZ de Belo Horizonte - MG	RIFI	Spiewak, 1992
95,00	Cães oriundos da campanha de vacinação anti-rábica de Jaboticabal - SP	ELISA	Furuta et al., 2004
22,80	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	CF	Bicalho et al., 2001
8,00*	Cães de áreas rurais do estado de São Paulo	PCR	Lopes et al., 2006
9,53	Cães com inclusões em leucócitos sugestivo de <i>Ehrlichia</i> em Jaboticabal - SP	PCR	Dagnone et al., 2004
9,70	Cães com inclusões intraplaquetárias de Campo Grande - MS	PCR	Souza et al., 2004

*Prevalência de cães de área rural, ES – Esfregaço Sanguíneo, RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta, ELISA – Ensaio Imunoenzimático, CF – Citometria de Fluxo, PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

2.3 Breve Histórico da Babesiose

As espécies do gênero *Babesia* são protozoários parasitas, transmitidos biologicamente por carrapatos, que podem causar doenças severas em animais silvestres e domésticos (KUTLER, 1988).

Infecções por *Babesia* spp. provavelmente vêm complicando a vida dos seres humanos desde a antiguidade, principalmente através das infecções em animais domésticos. O livro bíblico do Êxodo pode conter a primeira referência "histórica" à infecção por *Babesia*, onde encontra registrado que a praga de gado dos egípcios é descrita como uma "grave peste", que poderia ter sido a febre da água vermelha de bovinos (causada por *B. bovis*), o que mostra que poderia ter incluído a hemoglobínúria como um sinal predominante (HOMER et al., 2000).

Parasitas do gênero *Babesia* foram primeiramente reconhecidos por Victor Babés, em 1888. Nesta época, o pesquisador procurava determinar a causa de uma doença grave que estava acometendo os bovinos no delta do rio Danúbio, na Romênia. O autor chegou à conclusão que o agente etiológico que estava provocando a enfermidade, denominada hemoglobínúria enzoótica, era um pequeno organismo cocóide, intraeritrocítico, por ele chamado *Haematococcus bovis*. Posteriormente, em 1893, Starcovici, um dos pesquisadores do grupo de estudos de Babés, reavaliou o parasito, denominando-o *Babesia bovis*, em homenagem a seu descobridor. Nesse mesmo ano, Smith e Kilborne, ao estudarem a etiologia da febre do Texas, na América do Norte, concluíram que se tratava de um agente semelhante ao parasito descrito por Babés, porém o denominaram de *Pyrosoma bigeminum* desconsiderando a denominação prévia dada por Starcovici para parasitas do mesmo gênero. Esses pesquisadores estabeleceram pela primeira vez a relação da transmissão de um protozoário patogênico por um artrópode, no caso o ixodídeo *Boophilus annulatus*. Essa descoberta abriu um enorme campo de pesquisa sobre o papel desempenhado pelos artrópodes na transmissão de inúmeros patógenos, incluindo *Plasmodium* spp.

Babesia canis foi descrita pela primeira vez por Piana & Galli-Valerio em 1895, na Itália. A doença nos cães era conhecida como "Malignant jaundice" e "Malignant malarial fever" (WENYON, 1926). A partir dessa descrição, a espécie foi observada na Europa, África, Ásia, América do Norte e América do Sul (RISTIC, 1988). *Babesia gibsoni* foi descrita pela primeira vez na Índia, em 1910, por Patton (WENYON, 1926).

Só na segunda metade do século XX, as infecções por *Babesia* spp. foram consideradas como ameaça para a saúde humana, ganhando o título de uma zoonose emergente. O primeiro caso de babesiose humana foi diagnosticado em 1957 na Iugoslávia, causado por *B. bovis* (MASSARD; FONSECA, 2004).

2.4 Nomenclatura e Classificação Taxonômica

Segundo Levine et al. (1980), o gênero *Babesia* possuía a seguinte classificação: Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae, Gênero *Babesia*.

Atualmente os protozoários do gênero *Babesia*, pertencem ao Filo Protozoa, Subfilo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Piroplasmorida, Família Babesiidae (O'DWYER; MASSARD, 2002).

A identificação de espécies do gênero *Babesia* era baseada, tradicionalmente, na especificidade do hospedeiro e no tamanho e aparência morfológica das formas intraeritrocitárias, frequentemente referidas como piroplasmas (LEVINE, 1988). Além destes critérios biológicos, tais como morfologia e ciclo de vida, atualmente as ferramentas moleculares tornaram possível comparar determinadas sequências de genes do genoma de diversos protozoários (UILENBERG, 2006). Isto tem levado a novas descobertas e mudanças de gêneros.

2.5 Aspectos Epidemiológicos

2.5.1 Espécies de *Babesia* que infectam cães

Babesia canis Piana & Galli-Valerio, 1895 e *B. gibsoni* Patton, 1910 são reconhecidas como as duas espécies que causam a babesiose canina. *Babesia canis*, também chamada de grande babesia (3,0 a 5,0µm), geralmente aparece como um único piroplasma ou em pares simples ou múltiplos de merozoítas divididos por fissão binária dentro do eritrócito (SOULSBY, 1987). Apresenta uma ampla distribuição com alta prevalência nas regiões tropicais e subtropicais (TABOADA et al., 1992), sendo encontrada na África, Ásia, Austrália, Europa e nas Américas (MARTINOD et al., 1986; UILENBERG et al., 1989). *B. gibsoni*, conhecida como pequena babesia (1,0 a 2,5µm), é encontrada na Ásia, América do Norte, África (LOBETTI, 1998), Europa (CONRAD et al., 1991; CASAPULLA et al., 1998; BIRKENHEUER et al., 1999) e no Sul do Brasil (TRAPP et al., 2006a).

Estudos com base na distribuição geográfica, espécie de carrapato vetor, diferenças nas propriedades antigênicas e na patogenicidade demonstraram que, apesar da semelhança morfológica entre os isolados de *B. canis* encontrados por todo o mundo, estes diferem entre si (REICHENOW, 1935; UILENBERG et al., 1989; LEWIS et al., 1996; HAUSCHILD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997).

Assim, Uilenberg et al. (1989) propuseram um sistema trinomial de nomenclatura para diferenciar as três subespécies de *B. canis* em um nível taxonômico: *Babesia canis canis* transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* no norte e sul da África, na América, Ásia, Austrália e Europa e *B. canis rossi* transmitida por *Haemophysalis leachi* na África do Sul.

No Brasil, *B. canis vogeli* é a principal subespécie que acomete os cães (VIDOTTO; TRAPP, 2004), porém já foi isolada *B. gibsoni* no Brasil (TRAPP et al., 2006a).

Citard et al. (1995) revelaram haver grande variedade genética entre os diversos isolados de *B. canis*. Essa variabilidade foi demonstrada por Zahler et al. (1998), que discriminaram três genogrupos de *B. canis*, com base nas características genotípicas, correspondentes às subespécies propostas anteriormente. Já Carret et al. (1999), distinguiram as três subespécies por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento, comprovando haver variedade genética entre os diferentes isolados de *B. canis*.

Tradicionalmente, todos os pequenos piroplasmas caninos eram identificados como *B. gibsoni* com base na suposição de que nenhuma outra espécie de pequena *Babesia* infectava cães (CACCIO et al., 2002). Segundo Kjemtrup et al. (2000a), os isolados de *B. gibsoni* são morfologicamente idênticos, porém, análises filogenéticas do gene 18S rRNA têm mostrado que existem pelo menos três espécies distintas: uma da Ásia, outra da Califórnia e uma terceira da Europa. O isolado asiático é o organismo original encontrado na Índia, sendo considerado *B. gibsoni sensu stricto* (PATTON, 1910; TRAPP et al., 2006b). O isolado da Califórnia é uma espécie diferente com algumas características do gênero *Theileria* (KJEMTRUP et al., 2000b). E, o nome *B. conradae* foi recentemente proposto para este isolado (KJEMTRUP et al., 2006). O isolado da Europa é uma *Theileria*, com parentesco próximo a *B. microti* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003), que tem sido nomeada *Theileria annae* (ZHALER et al., 2000; CAMACHO et al., 2001).

Cacció et al. (2002) por meio de análise molecular, constataram que ambas as subespécies *B. canis canis* e *B. canis vogeli* foram responsáveis por infecções naturais e ocorrência da babesiose canina na Europa. Do mesmo modo, Inokuma et al. (2004), utilizando a PCR, conseguiram confirmar que os casos de babesiose canina ocorridos em Okinawa, Japão, eram causados por *B. canis* (6,3%) e *B. gibsoni* (8,8%). Além disso, por meio dessa técnica puderam afirmar com precisão que, a subespécie em questão, tratava-se de *B. canis vogeli*.

Alguns trabalhos demonstraram a infecção de cães por outras espécies pequenas como *T. equi* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003, FRITZ, 2010), *B. microti*-like (ZHALER et al., 2000) e *B. conradae* (KJEMTRUP; CONRAD., 2006).

Fritz (2010) avaliando cães e equinos da França identificou através da PCR, *B. canis canis* e *B. canis rossi* em equinos e *T. equi* e *B. caballi* em cães, mostrando que os piroplasmas não são tão hospedeiro-específicos.

Neitz e Steyn (1947), transmitiram *B. canis* para *Canis mesomelas mesomelas* (Chacal de dorso preto) esplenectomizado e não esplenectomizado e mostraram que havia provas suficientes para afirmar que *B. canis* além de não ser específica de *Canis familiaris*, era sinônimo de *Babesia rossi* descrito por Nuttall, em 1910, em *Canis adustus* (Chacal de flanco listrado).

Birkenheuer et al. (2003) assinala a importância de se diagnosticar as espécies, subespécies e genótipos que causam a babesiose canina, uma vez que a virulência, prognóstico e resposta às drogas babesicidas podem ser diferentes para cada microrganismo.

2.5.2 Vetores, reservatórios e formas de transmissão

Os carrapatos são os únicos vetores biológicos de parasitos da família Babesiidae (LEVINE, 1971). Os vetores da babesiose canina são carrapatos da família Ixodidae (MAHONEY, 1977).

Os protozoários são transmitidos naturalmente ao cão por meio da saliva de um carrapato infectado por ocasião de sua picada para alimentação. Os esporozoítos infectantes presentes nas glândulas salivares penetram nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado onde se diferenciam em trofozoítos. Estes se multiplicam por fissão binária (reprodução assexuada) e dão origem a dois, quatro, oito ou mais merozoítos. Após intensa multiplicação, os eritrócitos se rompem e os merozoítos livres tornam a invadir outros eritrócitos (UILENBERG, 2006). Alguns trofozoítos aumentam de tamanho e assumem um aspecto ovóide, sendo chamados de gamontes (WENYON, 1926; MARCONDES, 2009).

Quando ingeridos por um carrapato, os trofozoítos que não se diferenciaram em gamontes não se desenvolvem. Já os gamontes, penetram nas células epiteliais do intestino, onde adquirem projeções citoplasmáticas que lhes conferem um aspecto raiado (“ray-bodies”)

(KOCH, 1906). Estas formas uninucleadas fundem-se, formando um zigoto móvel (MEHLHORN; SCHEIN, 1984) que por sua vez origina um cineto (algumas vezes referidos como “vermiculos”), alongado e móvel, que se multiplica, deixa a célula intestinal e cai na hemocele, invadindo vários órgãos do carrapato, onde dará origem a vários esporocinetos. Alguns esporocinetos invadem os ovários onde se multiplicam e penetram nos oócitos, consequentemente infectando os ovos e transmitindo a infecção para a próxima geração (transmissão transovariana) (UILENBERG, 2006). Este tipo de transmissão permite a manutenção da infecção nos carrapatos vetores por várias gerações sucessivas (BRUMPT, 1938; SHORTT, 1973). Segundo Soulsby (1987), em seus estudos, carrapatos alimentados por cinco gerações em ouriço, foram capazes de transmitir *B. canis* para cães. A manutenção e persistência no carrapato vetor são asseguradas pelas transmissões transovariana e transestadial, às vezes persistindo por várias gerações de carrapato (CHAUVIN et al., 2009).

Na transmissão transestadial, os parasitos se desenvolvem na hemocele das larvas originárias dos ovos infectados, das ninfas e dos adultos provenientes dessas larvas; ou na hemocele do carrapato que se infecta no estágio de larva ou ninfa e transmite ao se alimentar como ninfa ou adulto em outro hospedeiro. Multiplicam-se originando pseudocistos, que se rompem liberando os parasitos, estes invadem e multiplicam-se nos músculos do carrapato, por diversas divisões binárias. Não há infecção em outros órgãos até que o estágio posterior inicie sua alimentação no hospedeiro, onde os parasitos migram até as glândulas salivares, penetram e se multiplicam formando os esporozoítos infectantes (VIDOTO; TRAPP, 2004; UILENBERG, 2006). O carrapato só se torna transmissor-infectante após a fixação, quando os esporozoítas amadurecem tornando-se verdadeiramente infectantes (UILENBERG, 2006). Reichenow (1935) observou que todos os três estágios de *R. sanguineus* podem transmitir *B. canis*, porém, os adultos tanto machos quanto fêmeas, seriam transmissores mais eficientes, enquanto as larvas só transmitiriam quando usadas em grande número.

Nos carrapatos que exigem para seu ciclo evolutivo mais de um hospedeiro (como é o caso de *R. sanguineus*), pode ocorrer tanto a transmissão transestadial (SHORTT, 1936) quanto a transmissão transovariana (BRUMPT, 1937).

No Brasil, o principal agente etiológico da babesiose canina é a *B. canis vogeli*, associada à alta incidência do carrapato vetor *R. sanguineus* (PASSOS et al., 2005; VIDOTTO; TRAPP, 2004), que apresenta prevalência e intensidade de infestação crescentes em todo país (LABRUNA, 2004). Estudos revelaram que este ixodídeo pode realizar até quatro gerações por ano no Brasil, indicando que as condições ambientais são favoráveis à ocorrência de infestação por este vetor em todas as estações do ano (LOULY, 2003). Este carrapato também é considerado o principal vetor de *B. gibsoni* no Brasil, além de estar sempre presente em áreas onde a babesiose canina é endêmica (ARAGÃO; FONSECA, 1961; LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES et al., 2004).

Outros dois vetores conhecidos de *B. gibsoni*, *Haemaphysalis longicornis* e *H. bispinosa* (SWAMINATH, 1937; GROVES; DENNIS, 1972; OTSUKA, 1974), ainda não foram identificados no Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001). As subespécies *Babesia canis canis* e *B. canis rossi*, que ainda não foram encontradas no Brasil, são transmitidas pelos carrapatos *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*, respectivamente (UILENBERG et al., 1989).

Estudos realizados no Japão com cães com e sem histórico de brigas, demonstrou maior incidência de *B. gibsoni* no grupo com histórico de brigas. Os autores sugeriram que os cães infectaram-se com o sangue do animal parasitado no momento da briga (MATSUU et al., 2004).

Fukumoto et al. (2005) relataram a primeira confirmação de transmissão transplacentária da infecção de *B. gibsoni*. Um grupo de cadelas prenhas foi infectado ocorrendo um abortamento e o nascimento de quatro filhotes, todos os quatro apresentaram

hipotermia, anemia, anorexia, esplenomegalia, hepatomegalia e coma, antes de morrerem, além disso, o DNA de *B. gibsoni* foi detectado nos tecidos dos filhotes, indicando que houve a infecção destes filhotes, provavelmente por via transplacentária.

Breitschwerdt et al. (1983), relataram a transmissão transplacentária da babesiose canina em criações de cães da raça Greyhound no leste dos EUA, devido ao óbito de filhotes com idade inferior ao período de incubação da *B. canis*. Os animais apresentaram manifestação clínica e esfregaço sanguíneo positivo e as mães dessas ninhadas exibiram altos títulos de anticorpos anti-*B. canis*. O carrapato *R. sanguineus* foi encontrado tanto nos cães quanto nas instalações dos canis.

Ruas et al. (2002) ao examinarem esfregaços sanguíneos de canídeos silvestres do sul do Brasil encontraram *Babesia* spp. em um animal. Sugeriram que essa transmissão tenha sido efetuada por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp., pois somente este ixodídeo foi visualizado nos animais.

R. sanguineus é, provavelmente, a espécie de carrapato de maior distribuição mundial. É um ectoparasito quase exclusivamente de cães, mas pode ocasionalmente ser encontrado em outros hospedeiros como gatos, cavalos, bovinos e humanos. Além do desconforto e perda sanguínea, este artrópode pode transmitir patógenos como *B. canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* (TABOADA; MERCHANT, 1997). Este é o principal vetor da babesiose canina em áreas urbanas, conhecido como carrapato marrom do cão (SHAW et al., 2001).

Gazeta et al. (2004) analisaram a ocorrência de babesiose em pequenos roedores, sendo o primeiro relato de *Babesia* spp. em roedores no Brasil. Esses autores verificaram positividade para *Babesia* spp. em roedores presentes em áreas rurais próximas às áreas de grande densidade populacional, destacando a importância destes achados para o risco de casos de babesiose humana. Segundo os autores, esse fato reforça a importância dos achados do trabalho, já que *Rattus norvegicus* participa da fauna de roedores urbanos, portanto, convive com o homem graças ao seu comportamento comensal. *Rattus norvegicus* foi apontado como o principal reservatório de *Babesia* spp. entre as espécies de roedores comensais.

2.5.3 Distribuição geográfica

A primeira observação da babesiose canina causada por *B. canis* ocorreu, em 1895, na Itália, por Piana & Galli-Valerio (O'DWYER et al., 1997). *Babesia gibsoni* foi descrita pela primeira vez na Índia, por Patton em 1910, parasitando cães (ZHALER et al., 2000). *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). *B. canis* está distribuída mundialmente, sendo descrita na África, Américas, Ásia e Europa (ABDULLAHI et al., 1990). As subespécies 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; FÖLDVARI et al., 2005) e *B. canis vogeli*, no norte e sul da África (MATJILA 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; MUNIZ, 1936) e tem sido reportada em muitos estados brasileiros. A prevalência da *B. canis* no Brasil varia consideravelmente (0,34 a 95%) de acordo com o método de diagnóstico utilizado, época do ano e amostra populacional utilizada (COSTA-JUNIOR, 2007).

2.5.4 Fatores associados à babesiose canina

Bicalho et al. (2002), realizaram infecção experimental de cães por amostras de *B. canis* isoladas em Minas Gerais e observaram que o aparecimento de hemácias parasitadas na circulação sanguínea ocorreu entre 2 e 3 dias após a inoculação, com o pico de parasitemia ocorrendo no 3º dia. Por sua vez, a partir do 4º dia houve redução drástica dessa manifestação, fazendo com que o encontro de hemácias parasitadas passasse a ser um achado inconstante. Além disso, verificou-se que o parasitismo do sangue capilar sempre foi superior ao do sangue venoso e que o volume globular médio (VGM) apresentou queda. Os autores concluíram que a baixa parasitemia observada, associada à ausência de manifestações clínicas demonstraram que as amostras presentes nesse meio eram de baixa patogenicidade.

Massard et al. (2006) constataram em seus estudos sobre babesiose canina na Zona Oeste do Rio de Janeiro que de 187 cães avaliados por diagnóstico em esfregaço sanguíneo, 46% estavam infectados por *Babesia* spp.

Miranda et al. (2008) verificaram em Campos dos Goytacazes, RJ a ocorrência de babesiose canina através de esfregaços sanguíneos delgados, preparados com sangue capilar colhido por punção auricular. O diagnóstico foi por pesquisa direta, visualizando-se os agentes etiológicos, onde 1,47% foram considerados infectados por *Babesia* spp., confirmando, assim, a presença destes parasitos na cidade de Campos dos Goytacazes, onde o clima é favorável ao desenvolvimento do vetor natural.

O' Dwyer (2000) em seu trabalho de diagnóstico de hemoparasitos e carrapatos em cães de área rural em três mesorregiões do RJ verificou pelo método de esfregaço sanguíneo que, 45,2% dos cães apresentaram-se positivos para hemoparasitos, sendo que a positividade variou de 11,5% em Mangaratiba à 71,8% em Pirai. *Babesia canis* foi observada em 5,2% dos cães e *Ehrlichia canis* em 4,8%. Com relação à prevalência, a região de maior prevalência foi a de Mangaratiba (63,6%) e a de menor prevalência foi Miguel Pereira (20%). Foram encontradas quatro espécies de carrapatos parasitando os cães: *Rhipicephalus sanguineus* (12,4%), *Amblyomma cajennense* (23,6%), *A. aureolatum* (2,8%) e *A. ovale* (2%).

Soares et al. (2006) verificaram a ocorrência de infecção simultânea por *B. canis* e *E. canis* em 2% dos cães estudados, a maioria acometida era da raça Pastor Alemão, criados em casas com quintal gramado.

Dell'Porto (1993) constatou soropositividade para *B. canis*, por meio da RIFI em 42,7% dos cães de rua da cidade de São Paulo, em comparação com o diagnóstico de apenas 10,3% utilizando o esfregaço sanguíneo. Também foi verificada maior soropositividade das fêmeas em relação aos machos. O mesmo autor constatou soroprevalência superior para *B. canis* em cadelas do que nos cães machos e atribuiu este fato devido as fêmeas serem mais sedentárias, principalmente no período pós-parto, quando permanecem grande parte do tempo em seus ninhos, o que as torna mais vulneráveis a infestações de *R. sanguineus*, ixodídeo de hábito nidícola.

Almeida et al. (2002) compararam a ocorrência de babesiose e erliquiose entre cães de rua e domiciliados, no município de Campos dos Goytacazes-RJ e verificaram que os cães apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses foram significativamente mais positivos para esses hematozoários do que os domiciliados.

Em Belo Horizonte, Spiewak (1992) encontrou 34,1% e 78,4% de soropositividade à RIFI entre cães atendidos em clínicas e cães de rua, respectivamente, cuja variação foi atribuída a uma maior exposição dos cães de rua aos carrapatos vetores da *B. canis*. Não houve correlação entre soroprevalência e fatores como sexo, raça e forma de confinamento do cão domiciliado. A soropositividade foi inferior nos cães de até 24 meses, sendo a diferença mais pronunciada entre cães até seis meses. A justificativa para esta diferença foi de que os filhotes sofreram a primo-infecção, mas seu organismo ainda não produziu resposta

imunológica. Por outro lado, a doença clínica foi significativamente mais prevalente entre os cães mais novos, concluindo-se haver diminuição da susceptibilidade à infecção à medida que o animal fica mais velho. Não foi encontrada associação entre a presença de anticorpos e sinais clínicos, fato justificado pela manifestação subclínica ser predominante nesta enfermidade.

Em levantamento realizado por Guimarães et al. (2002), 27% dos clínicos de pequenos animais de Minas Gerais citaram os cães de grande porte como mais vulneráveis à infecção por *B. canis*. Justificou-se que, por serem esses cães normalmente de guarda, teriam uma exposição maior ao carrapato vetor, e em contrapartida ao protozoário. Segundo 59% dos entrevistados, a idade mais susceptível seria a compreendida entre o nascimento e os dois anos de vida do cão. O verão representou, para 65% dos clínicos, a estação com maior número de casos, explicado pelo aumento do número de *R. sanguineus*, devido a temperatura e umidade elevadas.

Moura et al. (2002) verificaram por meio da técnica de esfregaço sangüíneo, que 50% das hemoparasitoses identificadas nos cães atendidos pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade de Cuiabá, eram devido *B. canis*, apesar desta detecção ter ocorrido em somente 2,5% dos animais.

Ribeiro et al. (1990) encontraram nos cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária da UFMG um percentual de 66,9% de animais soropositivos à babesiose canina por meio da RIFI, sugerindo que Belo Horizonte é uma área endêmica para esta enfermidade. A ocorrência de anticorpos anti – *B. canis* foi significativamente menor nos animais com até seis meses de vida, principalmente entre três a seis meses, concluindo, portanto, ser essa faixa etária a mais susceptível à doença. Deduziram que os anticorpos presentes nos cães com idade inferior a três meses eram devido a anticorpos colostrais ou à infecção transplacentária. Não foi encontrada diferença significativa entre os sexos.

Eiras et al. (2008) em seus estudos em Buenos Aires, Argentina, encontraram uma frequência de 0,2% (34/16.767) de parasitismo por *B. canis* spp. em esfregaços sanguíneos provenientes de cães domésticos. A partir da análise molecular de dois cães com alta parasitemia em lâmina foi verificado molecularmente e com posterior sequenciamento, que a subespécie envolvida foi *B. canis vogeli*. Este achado representou a primeira caracterização molecular de *B. canis vogeli* na Argentina.

Devido aos altos títulos encontrados à RIFI em canis de Greyhounds no Leste dos EUA, Breitschwerdt et al. (1983) sugeriram que a babesiose canina seja enzoótica nesta região e prevalente como infecção subclínica em animais utilizados para corrida.

Em estudo realizado na Índia, por meio de esfregaço sangüíneo, Bansal et al. (1985) verificaram uma prevalência de 13,3% para *B. canis* em animais da polícia, 5,4% nos cães de rua e de 2,3% em cães domiciliados. Nos cães de rua a infecção apresentou maior prevalência no período de julho a outubro, e nos cães domiciliados, de outubro a dezembro. A maior ocorrência nos cães de rua no período citado estaria relacionada à maior atividade do vetor *R. sanguineus* e também ao maior estresse calórico que os animais estariam sujeitos nesta época do ano, o que os tornaria mais susceptíveis à infecção. Ao exame sorológico, constataram prevalência de 40%, 37,5% e de 25%, nos cães da polícia, de rua e domiciliados respectivamente.

Martinod et al. (1986) em seus estudos sorológicos por meio da RIFI encontraram no sudeste da França, soropositividade de 62,4% para *B. canis*, muito embora a doença clínica se manifestou em apenas 14% dos cães, com mortalidade de 1,5%. Dentre os animais sadios, 85% apresentaram sorologia positiva, sendo observados níveis mais elevados de anticorpos à medida que as áreas pesquisadas apresentavam níveis crescentes de infecção. Verificaram que o sexo e a idade não constituíram fatores de risco para a babesiose canina. Em relação à raça

houve diferença estatística, entretanto, o motivo não foi atribuído à cor ou ao comprimento da pelagem ou à origem etnológica e tamanho do animal, ficando a causa indeterminada.

Levy et al. (1987) na Carolina do Norte, compararam por meio da RIFI, a prevalência de anticorpos anti-*B. canis* entre cães mantidos em abrigos e domiciliados. A média global encontrada foi de 3,8%, entretanto, os animais de abrigos apresentaram uma prevalência significativamente superior (5,7%) em relação aos de estimação (2,0%). Este fato foi associado ao hábito dos cães com origem na rua de vagar livremente, os quais apresentam, portanto, maior chance de exposição aos carrapatos e conseqüentemente de infecção, o que se contrapõe aos maiores cuidados e confinamento dos animais domiciliados. Constataram também ocorrência mais elevada de anticorpos nos cães de regiões de clima ameno, em relação aos de clima muito quente, concluindo que a distribuição de animais soropositivos apresentou correlação com a geografia e clima da região, fatores que estão associados à distribuição do *R. sanguineus*.

Harvey et al. (1988) verificaram em canil da Flórida que ninhadas de três semanas de vida apresentaram alterações clínicas e hematológicas condizentes com a babesiose canina. Embora a transmissão transplacentária não possa ser excluída, deduziram que os filhotes adquiriram a infecção após o nascimento, uma vez que além dos achados de normalidade clínica e hematológica observados nos cães adultos, o período de incubação da doença coincidiu exatamente com a idade dos filhotes.

Em região endêmica para babesiose canina na Nigéria, Bobade et al. (1989) detectaram pelo método de ELISA, 43,6% de soroprevalência para *B. canis*, sendo essa ocorrência significativamente inferior nos animais com até seis meses de vida. Também constataram que dos cães positivos ao esfregaço sangüíneo, 63,9% apresentaram anticorpos, o que indica que estes animais estavam tendo sua primoinfecção e a quantidade de anticorpos não estava sendo detectada pelo teste utilizado. Observaram também que a aquisição de imunidade via colostro explicaria a existência de títulos superiores nos cães de um a dois meses em relação aos de dois a seis meses, assim como o fato de nem todos os filhotes da mesma ninhada serem soropositivos. Não foi observada diferença significativa na prevalência em relação ao sexo e raça.

Abdullahi et al. (1990) verificaram na Nigéria que mais de 70% dos casos ocorrem em animais com idade igual ou inferior a um ano. As formas agudas e hiperagudas são encontradas precocemente em cães de até quatro semanas de vida.

Utilizando a RIFI, Taboada et al. (1992) observaram 46,1% de soropositividade para babesiose canina entre cães da raça Greyhound (galgo inglês) em canis da Flórida. A ocorrência foi significativamente maior nos canis que procuraram assistência veterinária para tratar os filhotes com suspeita de anemia, em relação aos que subjugaram este sinal atribuindo-o ao ectoparasitismo ou parasitismo intestinal e não procuraram por auxílio clínico. Os mesmos autores observaram que animais soronegativos para *B. canis* são mais aptos a participar de corridas, já que nenhum dos que competiram foi positivo à RIFI. Em canis de raças diversas, excetuando-se os Greyhounds da mesma região, não se constatou nenhum animal soropositivo. Essa maior soroprevalência da babesiose canina em Greyhounds foi atribuída ao stress causado tanto pelos deslocamentos contínuos que esses cães fazem devido a sua participação em corridas, quanto pelo fato desses locais possuírem uma grande aglomeração de cães, o que seria somado ainda à falta de atenção dos proprietários no controle de carrapatos. A participação dos cães em competições desportivas e a utilização rotineira de cães positivos como doadores de sangue têm grande relevância na disseminação da doença. Não houve relação entre sorologia positiva para *B. canis* e o fator sexo, enquanto que, animais até dois anos foram significativamente menos soropositivos, estando o aumento da prevalência relacionado com o avançar da idade associado à forma crônica da doença.

Yamane et al. (1994) estudaram a soroprevalência da babesiose canina em animais de diferentes abrigos em diversas localidades do sudoeste dos EUA, detectando maior soropositividade nos cães mais velhos, a qual foi atribuída tanto à chance aumentada de exposição ao carrapato pelo maior tempo de vida desses animais, quanto ao longo período de convalescença desta doença. Em relação à raça, não foi verificada associação, justificando-se que sendo esses animais de abrigo teriam a mesma chance de exposição ao vetor, pois independente da finalidade, porte, pelagem ou outra característica, estando no mesmo ambiente, animais da mesma raça possuiriam o mesmo manejo. Assim, estes cães estariam sujeitos ao mesmo risco de exposição ao vetor e conseqüentemente à infecção por *B. canis*. Houve associação entre sorologia positiva para *B. canis* e presença do carrapato *R. sanguineus*.

Shakespeare (1995) consultando as fichas clínicas de cães doentes atendidos em um Hospital Universitário na África constatou a ocorrência de 11,69% de casos de babesiose canina. Desse total, 31,4% foram classificados como de gravidade elevada, sendo necessário tratamento intensivo.

Na África do Sul, país onde a babesiose é uma das doenças mais freqüentes em cães, Collett (2000) constatou por meio de um levantamento realizado com clínicos veterinários, que 52,5% deles tratam de 100-500 casos dessa enfermidade por ano, o que representa 10% dos atendimentos de 54,7% desses profissionais. Ao mesmo tempo, 100% deles afirmaram diagnosticar essa doença na rotina da clínica utilizando o exame de esfregaço sangüíneo em 83% dos casos considerados clinicamente suspeitos. Também foi observado que esta enfermidade predomina no verão, estação onde se concentrariam 76,5% da ocorrência, sendo o restante distribuído igualmente durante todo o ano. Os clínicos entrevistados confirmaram também a maior susceptibilidade das raças de grande porte a essa doença.

Alguns trabalhos relataram que algumas raças de cães são mais susceptíveis de apresentarem manifestações clínicas da babesiose canina, destacando-se o Pastor Alemão, Fila, Galgo Inglês, Dobermann e Rottweiler (TABOADA et al., 1992; COLLET, 2000). Entretanto, esta maior susceptibilidade geralmente está associada ao tipo de aptidão e manejo ao qual cada raça é submetida, favorecendo a exposição ao carrapato ou ao desenvolvimento de doença clínica.

Silva (2011) realizou estudos sobre uma população de um canil de Setúbal, Portugal, no qual foram testados 80 cães (29 machos e 51 fêmeas) escolhidos aleatoriamente. Neste estudo foi realizado o rastreio de cinco doenças transmitidas por vetores, causadas pelos agentes: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* e *Leishmania infantum*. Os testes utilizados foram testes comerciais de imunofluorescência indireta (IFI). Dos animais testados 58,75% dos animais encontravam-se infectados (20% co-infectados e 38,75% monoinfectados). As prevalências de anticorpos contra os cinco agentes foram: *Rickettsia conorii* (23,75%), *Babesia canis* (20%), *Ehrlichia canis* (16,25%), *Leishmania infantum* (16,25%) e *Anaplasma phagocytophilum* (12,5%).

2.5.5 Fatores relacionados à presença do carrapato

B. canis vogeli está distribuída mundialmente, e principalmente onde haja a presença do carrapato vetor *R. sanguineus*, em diferentes locais com diversas características bioclimáticas especialmente onde existam cães, pelo fato de seu hábito de alimentação, sendo este, o principal carrapato de cães de zona urbana (RIBEIRO et al., 1997; SHAW et al., 2001; LABRUNA; PEREIRA, 2001). Outras espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando os cães no Brasil, tais como *Amblyomma ovale*, *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*. No entanto, a ocorrência de diferentes espécies em diversas localidades é resultante das características epidemiológicas particulares de cada região (O'DWYER, 2000).

Em áreas urbanas, a espécie de carrapato mais encontrada em cães é *Rhipicephalus sanguineus*, que se encontra distribuída em todas as regiões geográficas do Brasil (MASSARD et al., 1981; RIBEIRO et al., 1997). Em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas (MASSARD et al., 1981; LABRUNA et al., 2000). Na região Sudeste, as espécies de *Amblyomma* mais freqüentemente encontradas em cães de áreas rurais são *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense* (MASSARD et al., 1981). Na região Sul destacam-se as espécies *A. tigrinum* e *A. aureolatum*, embora pelo menos outras quatro espécies de *Amblyomma* já tenham sido relatadas em cães (FREIRE, 1972). Na região Norte, a espécie *A. oblongoguttatum* foi relatada como a de maior ocorrência, seguida por *A. ovale* e *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2000).

Estudos desenvolvidos no Brasil, incriminam a espécie *R. sanguineus* como a responsável pela transmissão tanto em nível de cidade como ao nível rural (O'DWYER et al., 2001). Esta espécie tem hábitos nidícolas, em sua fase de vida livre, podendo ser encontrada dentro de canis, no interior das residências e nos quintais das casas, escondendo-se em frestas e buscando abrigo em buracos das próprias instalações (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

O habitat do *R. sanguineus* foi descrito por Maroli et al. (1996) como sendo fundamentalmente constituído pelo ambiente urbano e peri-urbano, e teria o ninho do cão como seu local de predileção. Também responsabilizaram o aumento do número de cães no ambiente urbano e doméstico como sendo uma das causas da difusão numérica deste ixodídeo nas cidades. Em relação ao ciclo de vida deste vetor, afirmaram ter duração média de quatro a cinco meses, podendo, porém ser completado em apenas três meses dependendo das condições climáticas; sendo importante ressaltar que temperatura inferior a 18°C e umidade relativa do ar abaixo a 50% interferem no ciclo biológico do ixodídeo.

Ao realizar estudo no município de Pedreira, área rural do estado de São Paulo, Lemos et al. (1997) constataram que o *A. cajennense* foi a espécie de ixodídeo predominante dentre as seis encontradas tanto em animais, quanto em seres humanos e na vegetação. No cão essa espécie representou 73,5% das infestações por carrapatos, enquanto que o *R. sanguineus* significou apenas 26,5% deste percentual.

Em levantamento realizado nos cães de rua da cidade de Porto Alegre, Ribeiro et al. (1997) constataram que 52,4% dos animais apresentavam carrapatos, dos quais 93,2% eram *R. sanguineus*.

Ao estudar a freqüência de carrapatos em cães da região norte do estado do Paraná, Labruna et al. (2001) observaram que apesar de ser em área rural, *R. sanguineus* foi a espécie mais prevalente, muito embora sua freqüência tenha sido bem inferior em relação a estudos prévios realizados em áreas urbanas. Esse achado foi justificado pelo hábito nidícola deste ixodídeo, somado ao dos cães repousarem sempre no mesmo lugar, o que possibilitaria a essa espécie de carrapato se estabelecer na área rural.

O'Dwyer (2000) detectou parasitismo por carrapatos em 37,6% dos cães de áreas rurais do estado do Rio de Janeiro, sendo 23,6% por *A. cajennense* e 12,4% por *R. sanguineus*. Esta constatação reforçou a teoria do predomínio do *A. cajennense* em áreas rurais e do *R. sanguineus* em áreas urbanas e peri-urbanas observada em estudos prévios.

Rodrigues et al. (2001) em seus estudos em cães de rua na cidade de Juiz de Fora, MG, observaram que 60,6% dos ixodídeos encontrados nos cães de rua foram identificados como *R. sanguineus*, ressaltando a predominância desta espécie em áreas urbanas. Em contrapartida, a segunda maior infestação por carrapatos foi atribuída ao gênero *Amblyomma* spp., tendo a espécie *A. cajennense* a prevalência mais elevada, com um percentual de 11,5%. Atribuiu-se tal fato à proximidade das instalações dos cães com os pastos utilizados pelos eqüinos, os quais eram em grande número no local. Não foi constatada diferença significativa na ocorrência de *R. sanguineus* entre as estações do ano, sendo observados nas duas estações

avaliadas: inverno e verão, porém não foi observada diferença significativa para sua prevalência no inverno (60,8%) e no verão (60,3%); entretanto a intensidade média de parasitismo foi significativamente maior no verão (4,8 parasitas/hospedeiro), quando comparada ao inverno (2,96 parasitas/hospedeiro). Concluíram que esta ocorrência mais intensa no verão poderia resultar no aumento das hemoparasitose transmitidas aos cães por esta espécie de carrapato.

Szabó et al. (2001) ao estudarem as infestações ocorridas por ixodídeos em cães das áreas urbanas e rurais do município de Franca, no Estado de São Paulo, observaram que 100% dos carrapatos de cães urbanos eram *R. sanguineus*, enquanto que na área rural o parasitismo por esta espécie atingiu 50% dos animais. Constataram que um percentual de 66,7% dos cães das cidades vivia em regime semi-confinado, o que diferia do livre deslocamento realizado pelos cães da área rural. Concluíram que esta diferença na forma de criação dos cães poderia explicar o menor parasitismo do *R. sanguineus* no meio rural. Por esta espécie possuir hábito nidícola, a movimentação mais intensa do cão no ambiente rural diminuiria a chance dos estádios biológicos evolutivos de reinfestarem o seu hospedeiro após concluírem sua fase não parasitária. Ao avaliar a raça dos cães, verificaram que os animais mais parasitados foram os SRD, os quais participaram com 66,4% do total das infestações.

Moura et al. (2002) constataram que os carrapatos predominam sobre todos os outros ectoparasitas em Cuiabá, no Estado de Mato Grosso, principalmente devido à existência de uma extensa área de vegetação no perímetro urbano e pela presença de uma estação chuvosa bem definida nesta cidade.

Louly (2003), ao estudar a sazonalidade do *R. sanguineus* no canil da Polícia Militar de Goiânia, Goiás, observou que este vetor foi encontrado durante todo o ano, tanto em vida livre quanto parasitária, e que todos os estádios biológicos possuíam além de altas prevalências, níveis semelhantes independente de qual fosse a estação. Constatou ainda que este ixodídeo possui quatro gerações anualmente. Estes achados foram atribuídos às condições climáticas (temperatura e umidade relativa do ar) que se mantiveram ótimas no decorrer de todo o estudo, além da disponibilidade do hospedeiro que foi constante neste período. Foi sugerido haver susceptibilidade racial ou individual aos carrapatos por parte dos cães, por ser observada uma maior infestação na raça Cocker Inglês quando comparada aos cães sem raça definida (SRD). Além disso, confirmou-se o hábito nidícola deste carrapato devido à predominância significativamente superior de *R. sanguineus* nos canis do que nos diversos ambientes de vida livre inspecionados.

Labruna (2004) em revisão bibliográfica sobre o *R. sanguineus*, afirmou que a duração das fases de vida livre desta espécie é variável, sendo inversamente proporcional à temperatura ambiente. Também afirmou que a viabilidade destas formas durante a fase não parasitária é afetada principalmente pelas condições microclimáticas, em especial a umidade relativa do ar.

2.6 Aspectos Imunológicos

A resposta imune humoral se inicia em torno de sete dias após a infecção (BRANDÃO et al., 2003). A resposta imune celular é a mais importante no combate às infecções por *Babesia* spp. (VIDOTTO; TRAPP, 2004), entretanto não há imunidade cruzada entre as subespécies de *B. canis*. Anticorpos podem ser detectados cinco a doze dias pós-infecção, alcançando um valor máximo em torno do 21º dia, e a imunidade subespécie-específica apresenta duração de aproximadamente cinco meses, estando o hospedeiro susceptível à reinfecção após este período (VERCAMMEN et al., 1997).

Na ausência do parasita, a duração da resposta imune à *B. canis* é normalmente curta (VERCAMMEN et al., 1997). Entretanto, os cães podem entrar em estado de premunição

caracterizado pela manutenção do agente no organismo na ausência de sinais clínicos, com altos títulos de anticorpos anti *B. canis* e aparente resistência a infecções subsequentes (MASUDA et al., 1983) por um período de até um ano, o que pode ser resultado de imunidade protetora efetiva (MARTINOD et al., 1985).

A imunidade protetora aos protozoários do gênero *Babesia* spp. é mediada pelas repostas inata e adaptativa, além de produção balanceada de citocinas, uma vez que essas não estão envolvidas apenas no controle da infecção, mas podem contribuir com o progresso da doença. Enquanto a primeira envolve a participação de macrófagos e células *natural killer*, a última produz interferon- γ (INF- γ) requerido para ativação de macrófagos, que irão exibir maior expressão de receptores, atividade fagocitária e produção de mediadores de ação tóxica, como o óxido nítrico (AHMED, 2002). Recentemente foi demonstrado que a formação de ligação de IgG e IgM à membrana do eritrócito por mecanismos imunes parece estar presente na maioria das infecções por *B. canis vogeli*, porém não naquelas causadas por *B. canis canis* (CARLI et al., 2009).

2.7 Manifestações Clínicas, Patogenia e Achados Anatomopatológicos

B. canis ocorre na África, Europa, Américas e Ásia, sendo freqüente nos países tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A espécie *B. canis* possui três subespécies distintas: *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli*, (UILENBERG et al., 1989; TABOADA; MERCHANT, 1991). A distinção entre essas se baseia na especificidade do vetor, ausência de reações cruzadas e nível de patogenicidade.

Tem sido observado que as subespécies *B. canis canis* e *B. canis vogeli* possuem de baixa a moderada patogenicidade, com animais apresentando parasitemia transiente e infecção inaparente. A forma aguda é observada principalmente em infecções por *B. gibsoni* ou por *B. canis rossi*, sendo que esta última possui alta patogenicidade induzindo à doença fulminante pelo aumento exponencial da parasitemia (SCHETTERS et al., 1997).

A babesiose canina da África do Sul causada pela *B. canis rossi* é transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi*. Essa amostra é muito disseminada e é certamente a mais virulenta (UILENBERG et al., 1989, LOBETTI, 1998). Na Europa e na Ásia, a babesiose é causada pela *B. canis canis*, a qual possui nível intermediário de patogenicidade, sendo vetor o carrapato *Dermacentor reticulatus* (BOOZER; MACINTIRE, 2003).

Babesia canis vogeli é transmitida pelo carrapato vermelho, *Rhipicephalus sanguineus*, e causa uma doença relativamente branda nos EUA e nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (PASSOS et al., 2005).

A doença pode manifestar-se sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda e crônica, sendo que cães jovens são mais sensíveis e frequentemente apresentam as formas mais graves da doença (BREITSCHWERDT, 1993). Em casos graves pode levar à morte (ABDULLAHI et al., 1990).

Não existem sintomas patognomônicos da babesiose, sendo o diagnóstico clínico baseado na anamnese e em sinais clínicos como membranas mucosas pálidas, taquipnéia, taquicardia, febre, anemia, que pode ser do tipo hemolítica, icterícia, anorexia, letargia, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, eventualmente hemoglobinúria, e no diagnóstico anatomopatológico, coração e rins amarelados (ABDULLAHI et al., 1990).

A gravidade das manifestações clínicas está associada a diversos fatores, tais como: patogenicidade da espécie ou cepa envolvida, intensidade da parasitemia, resposta imune e idade do hospedeiro, nível de desafio do carrapato e estresse (MARTINOD et al., 1986; URQUHART, et al., 1996; SCHETTERS et al., 1997; JEFFERIES et al., 2003).

Alguns cães são aparentemente mais resistentes à infecção, sem demonstrar sinais de parasitemia (BRANDÃO et al., 2003) e a severidade das manifestações clínicas observadas na

doença está relacionada ao grau de multiplicação do parasita nos eritrócitos, com subsequente lise celular (LEISEWITZ et al., 2001), e patogenicidade das diferentes espécies de *Babesia* sp. e subespécies de *B. canis* (TABOADA, 1998), o que respaldou a classificação da doença em descomplicada ou complicada (JACOBSON, 2006). Além disso, outros fatores podem influenciar na apresentação da doença, como imunidade do hospedeiro, idade e doenças concorrentes (LOBETTI, 1998).

As manifestações clínicas da forma complicada são variáveis e decorrentes da intensa crise hemolítica ocasionada pelo parasita e da liberação sistêmica de fatores inflamatórios. Neste caso, há envolvimento adicional de órgãos que resulta em anemia, coagulopatia, icterícia, insuficiência renal aguda, hepatopatia, síndrome da angústia respiratória aguda, sinais nervosos, lesões miocárdicas, hemoconcentração e choque (LOBETTI, 1998; LOBETTI et al., 2002).

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

Cães que se recuperam da forma aguda da infecção, podem tornar-se portadores crônicos, mantendo baixa parasitemia, sem detecção do agente ao esfregaço sanguíneo (TODOROVIC, 1975). Entretanto, quando desafiados por condições imunossupressoras ou outras infecções, esses animais podem desencadear febre intermitente, anorexia, perda de peso, anemia, edema (NELSON; COUTO, 2001; FURLANELLO et al., 2005), fraqueza, esplenomegalia e mais raramente hemoglobinúria, petéquias e icterícia (SLOSS; KEMP, 1999; NELSON; COUTO, 2001; ALMOSNY, 2002). Alguns desses animais podem desenvolver sinais de outras enfermidades crônicas, como evidências patológicas de doença hepática e/ou glomerulonefrite (TABOADA, 1998). Dependendo do estágio de infecção, podem surgir ainda distúrbios nervosos, tais como decúbito com movimentos de pedalagem e coma, que são associados à agregação de eritrócitos nos capilares cerebrais (McGAVIN; ZACHARY, 2009).

No Brasil, a forma subclínica é provavelmente a apresentação predominante nos cães com babesiose (VIDOTTO; TRAPP, 2004) e tem importância relevante na manutenção dessa enfermidade, já que esses animais apresentam-se normais ao exame físico e à pesquisa direta do parasita em esfregaço sanguíneo, o que os torna importantes fontes de infecção para outros animais (MAIA, 2005).

Como a babesiose é considerada uma doença multissistêmica (JACOBSON, 2006), a forma complicada inclui manifestações que não podem ser explicadas diretamente pela hemólise e parecem ser resultado da resposta inflamatória do hospedeiro ao parasita, (MATIJATKO et al., 2010). Isto é evidenciado pela inflamação sistêmica e hipotensão associadas à diminuição não hemolítica do volume globular, seguida de distúrbios do sistema de coagulação e síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDMO) na fase aguda da doença, descritas por Schettters et al. (2009) e Matijatko et al. (2010).

Diferentes mecanismos de hemólise são propostos. Acredita-se que a destruição dos eritrócitos pode ser causada pela ação mecânica de *B. canis* nas células parasitadas (MAEGRAITH et al., 1957), caracterizando a hemólise intravascular observada predominantemente no início da infecção. Nas células não parasitadas a destruição é consequência do reconhecimento pelo sistema imune, uma vez que esses eritrócitos encontram-se marcados por antígenos do parasita aderidos às suas membranas (BOUNOUS et

al., 1993). A presença de anticorpos anti-membrana eritrocitária em cães infectados por *B. gibsoni* foi relatada (ADACHI et al., 1995). Estudos recentes revelaram aparente ausência de anemia hemolítica imune na infecção por *B. canis canis*, diferentemente daquelas causadas por *B. gibsoni* e, provavelmente, por *B. canis vogeli* (CARLI et al., 2009).

A lise das hemácias produz mediadores inflamatórios de ação sistêmica que, em processos hemolíticos graves, causam vasodilatação periférica e hipotensão (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002), logo a hipotensão é induzida e dependente do número de eritrócitos infectados por *B. canis* (SCHETTERS et al., 2009). O óxido nítrico também contribui para a vasodilatação em quadros hipotensivos na babesiose canina complicada (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Além disso, há agregação e interação entre eritrócitos infectados e o tecido endotelial, facilitadas pela hipotensão (SCHETTERS et al., 1998) e a grande concentração de eritrócitos parasitados no interior dos capilares do sistema nervoso central pode ser responsável pelas manifestações neurológicas ocasionalmente vistas na doença (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

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

Pode ocorrer degeneração das células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos, anóxia, acúmulo de produtos metabólicos tóxicos, fragilidade capilar e, eventualmente, perda de eritrócitos e hemorragia macroscópica. Em casos severos, pode-se observar coagulação intravascular disseminada (LEVINE, 1985). A morte é devido à falência do organismo e choque sistêmico, não sendo apenas devido à destruição dos eritrócitos, mas também devido à obstrução dos capilares de vários órgãos por células parasitadas (LEVINE, 1985), consequência dos tampões celulares formados pela ativação do sistema de coagulação (SCHETTERS et al., 1998; HOMER et al., 2000).

No diagnóstico *post mortem* os animais infectados por *B. canis* podem apresentar-se com perda muscular, anêmicos e ictericos. A injúria vascular é evidenciada por hemorragias e edema, que pode ser severo nos pulmões. O baço pode estar aumentado de tamanho e firme, com polpa vermelha hiperêmica e corpúsculos proeminentes, enquanto os rins apresentam coloração marrom escura. O fígado pode estar aumentado de volume e marrom-amarelado e, na vesícula biliar, observa-se bile espessada e abundante. Histologicamente, podem ser observados eritrócitos parasitados obstruindo capilares do córtex cerebral, além de microtrombos em vários tecidos do animal (VALLI, 2007).

2.8 Achados Laboratoriais

2.8.1 Hematológicos

Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado grande diversidade de alterações hematológicas decorrentes da babesiose canina. Dentre as alterações, podem ser verificadas 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, porém ainda sem tempo de resposta medular levando a característica arregenerativa e momentânea da anemia 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 subespécie de *Babesia* que acomete cada animal (ZYGNER et al., 2007).

Miranda et al., (2008) verificaram que o tipo de anemia mais frequentemente encontrado na babesiose canina é do tipo normocítica normocrômica, que pode ser observada na fase aguda da doença, quando os piroplasmas são facilmente visualizados no esfregaço sanguíneo, porém ainda sem tempo de resposta medular levando a característica arregenerativa e momentânea da anemia.

Vasconcelos (2010) avaliou cães com babesiose residentes na região periurbana de Brasília, onde 39,5% deles não apresentaram anemia. Alguns estudos apontam que a anemia nem sempre é vista em animais adultos assintomáticos sorologicamente positivos para *B. canis* (TABOADA; MERCHANT, 1997).

Costa-Júnior et al. (2009) relataram que em cães saudáveis, o hematócrito abaixo de 30% não se constituiu um fator de risco relacionado à soroprevalência de *B. canis vogeli*. Braga (2011) relatou em seus estudos que é importante ressaltar que, uma vez que os cães com contagem de hemácias e hematócrito dentro da normalidade foram mais propensos à soropositividade para babesiose, animais com estes parâmetros normais não devem ter excluída a possibilidade de infecção por *B. canis*.

Gopegui et al. (2007) verificaram em seus trabalhos, trombocitopenia em todos os cães positivos para babesiose. Lobetti et al. (2002) relataram que a trombocitopenia moderada à severa é comum na babesiose canina independente da subespécie envolvida.

Alterações leucocitárias são observadas de forma variada, mas incluem leucopenia, leucocitose, neutrofilia ou neutropenia, linfocitose e eosinofilia (VERCAMMEN et al., 1997). Estes parâmetros podem encontrar-se alterados decorrentes também de uma co-infecção por outros agentes. 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).

Vasconcelos (2010) verificou que dentre as alterações observadas no leucograma de animais positivos para *Babesia canis* sp., ressaltou que a monocitose esteve presente em 86,04% dos animais infectados.

Leucopenia ou leucocitose têm sido descritas em diferentes estágios da babesiose (GUELFÍ; CANDEBAT, 1998), contudo a leucopenia têm se mostrado um achado importante na fase aguda da doença (BARIC RAFAJ et al., 2007).

Braga (2011) verificou em seus estudos de babesiose canina em cães de hospitais e clínicas veterinárias do Estado do Piauí, Brasil, que as alterações leucocitárias, não constituíram fator associado à soropositividade para a babesiose canina.

2.8.2 Bioquímicos

Os valores da bioquímica sérica são inespecíficos e comumente normais, porém dependem da gravidade da doença e do grau de hipóxia. Pode ser observada hipocalemia em animais gravemente afetados, mas este é provavelmente um achado inespecífico, em decorrência da redução da ingestão de potássio (TABOADA; MERCHANT, 1997), aumento da excreção renal, perdas gastrintestinais ou deslocamento para o espaço intracelular (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Azotemia e acidose metabólica são comuns, geralmente

causadas pela desidratação e/ou choque e parecem contribuir para a morbidade e mortalidade. Ambas são comumente causadas por *B. canis*, mas não por *B. gibsoni*. Durante a moléstia grave, as atividades das enzimas hepáticas podem estar aumentadas, em consequência da hipóxia anêmica do órgão (TABOADA; MERCHANT, 1997). Há relatos de aumento dos níveis séricos de uréia, creatinina, elevação da atividade de aspartato amino-transferase (AST) e aumento da atividade de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). A hiperbilirrubinemia é um achado consistente durante a fase aguda da infecção por *Babesia canis*, mas não por *B. gibsoni* (HOSKINS et al., 1993). *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) observaram hipoalbuminemia em 31% dos casos de babesiose canina avaliados em seus estudos.

Na urinálise, é possível a observação de bilirrubinúria, hemoglobinúria, acompanhada ou não de proteinúria e cilindros granulares (TABOADA; MERCHANT, 1997), bem como a presença de células do epitélio renal, o que pode ser indicativo de lesão renal aguda decorrente de hemoglobinúria ou hipoperfusão do órgão (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

2.9 Métodos de Diagnóstico e suas Vantagens e Desvantagens

O diagnóstico desse grupo de hemoparasitos é realizado, principalmente, com base nos sinais clínicos e laboratoriais, através de observação microscópica das estruturas parasitárias em esfregaços sanguíneos corados, pela detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos e por técnicas de biologia molecular.

O diagnóstico clínico é feito com base nos sintomas e histórico de infestação por carrapatos. Entretanto, como estes sintomas são inespecíficos, torna-se imprescindível a realização de exames laboratoriais para confirmar a suspeita clínica (O'DWYER; MASSARD, 2002). Diante destes fatos, o diagnóstico laboratorial direto ou indireto destaca-se por fornecer maior confiabilidade ao clínico veterinário (BÖSE et al., 1995).

2.9.1 Diagnóstico microscópico

Os agentes da babesiose canina podem ser visualizados diretamente por meio do exame parasitológico de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa ou pela coloração de Romanowsky (HARVEY et al., 1978; WOODY; HOSKINS, 1991; TABOADA, 1998; MARTIN et al., 2005).

Quanto à morfologia, os merozoítos de *B. canis* (2,4 µm x 5,0 µm) são piriformes e frequentemente ocorrem em pares, porém, oito ou mais estruturas podem estar presentes no mesmo eritrócito (LOBETTI, 1998). Os merozoítos de *B. gibsoni* (1,0 µm x 3,2 µm) são pleomórficos, sendo encontrados com maior frequência na forma oval, podendo adquirir formato de anel.

O diagnóstico de *B. canis* realizado pela observação direta do agente no esfregaço sanguíneo é rápido, de baixo custo e altamente específico, porém, de baixa sensibilidade, pois a parasitemia é variável de acordo com a fase da doença, dificultando a visualização de eritrócitos circulantes parasitados (VERCAMMEN et al., 1995). Além disso, a distinção morfológica de cepas e espécies semelhantes torna-se mais difícil ou impossível (KRAUSE et al., 1996). Outro obstáculo relacionado ao diagnóstico microscópico é o treinamento do técnico relacionado à diferenciação das estruturas observadas. A não detecção do parasito em esfregaço sanguíneo não significa ausência de infecção. Além disso, sabe-se que, existem variações nas manifestações patológicas entre as espécies e subespécies de *B. canis* e,

portanto, a detecção e identificação acurada são imperativas no diagnóstico de infecções individuais (JEFFERIES et al., 2007).

2.9.2 Diagnóstico sorológico

Diante das limitações discutidas anteriormente frente ao diagnóstico microscópico direto, os métodos sorológicos têm sido usados para diagnóstico de infecções com baixos níveis de parasitemia, crônicas ou subclínicas (BOOZER; MACINTIRE, 2003).

Os métodos de diagnóstico indireto (detecção de anticorpos do agente por meio de testes sorológicos) são muito empregados em pesquisas epidemiológicas e para avaliação de medidas preventivas (REITER; WEILAND, 1989; GUGLIELMONE et al., 1997; PASSOS et al., 1998; SAHIBI et al., 1998; KATSANDE et al., 1999).

Os testes sorológicos são técnicas simples e sensíveis, entretanto a inabilidade para distinguir uma infecção atual tanto de uma exposição prévia sem estabelecimento de infecção, quanto de uma infecção prévia é um dos maiores empecilhos deste tipo de diagnóstico (IQBAL et al., 1994; RIKIHISA et al., 1994; DAWSON et al., 1996; WEN et al., 1997). Além disto, são pouco específicos, pois pode ocorrer reação cruzada entre espécies, devendo-se associar a presença de anticorpos séricos com outros testes de diagnóstico (ANDERSON et al., 1980; YAMANE et al., 1993; DUMLER et al., 1995; WANER et al., 2001).

Entre as técnicas sorológicas, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido a mais amplamente utilizada por sua alta sensibilidade, baixo custo e fácil operacionalidade, tendo sido bastante empregada em pesquisas epidemiológicas (BÖSE et al., 1995; ABOGE et al., 2007). Entretanto, a soropositividade não indica necessariamente a presença do parasito e sua especificidade é limitada uma vez que pode ocorrer resultado falso-positivo por exposição prévia ao parasita, permanência de anticorpos colostrais em filhotes até cinco meses após o nascimento e não reversão do *status* sorológico do animal para negativo após autoesterilização ou quimioesterilização (MAIA, 2005), após a qual o cão pode permanecer soropositivo por longos períodos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) e, além disso, pode também ocorrer reações cruzadas (BOBADE et al., 1989; MAIA, 2005). Existem relatos de que o diagnóstico utilizando a RIFI para detecção de anticorpos de *Babesia*, também não é específico, devido à reatividade cruzada antigênica entre as espécies e ainda entre os gêneros (YAMANE et al., 1993).

É comum a ocorrência de resultados falso-negativos em infecções recentes, uma vez que são necessários de cinco a 10 dias após a infecção para detecção de anticorpos anti-*Babesia* (TABOADA; MERCHANT, 1997; BOOZER; MACINTIRE, 2003).

A técnica de “Western Immunoblotting”, o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e testes sorológicos rápidos como o dot-ELISA também são utilizados para detecção de anticorpos contra estes agentes (MARTINOD et al., 1985; BOBADE et al., 1989; BÉLANGER et al., 2002; HARRUS et al., 2002; TORRES et al., 2002).

Goo et al. (2008) no Japão estudaram a proteína adesiva trombospondina de *Babesia gibsoni* (BgTRAP), que é conhecida como um antígeno imunodominante e é, por conseguinte, considerada candidata para o desenvolvimento de um reagente de diagnóstico para a babesiose canina. A BgTRAP recombinante (rBgTRAP) expressa em *Escherichia coli* foi testada em ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos para *B. gibsoni* em cães. O ELISA com rBgTRAP diferenciou claramente entre os soros de cães com *B. gibsoni* e soros de cães livres de patógenos específicos (SPF). Os soros coletados de cães experimentalmente infectados com parasitas estreitamente relacionadas, *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi*, e *Neospora caninum*, não mostraram reatividade cruzada pelo ELISA com rBgTRAP. Um total de 107 amostras de sangue colhidas a partir de cães que foram diagnosticados como tendo babesiose em hospitais veterinários no Japão foram

examinados para o diagnóstico de infecção por *B. gibsoni* através de ELISA e PCR. Noventa e seis (89,7%) e 89 (83,2%) amostras testadas foram positivas pelos métodos de ELISA e PCR, respectivamente, enquanto que 11 (10,3%) e 4 (3,7%) foram ELISA+/PCR- e ELISA-/PCR+, respectivamente. Além disso, a sensibilidade do teste de ELISA com rBgTRAP foi muito maior do que a de Testes ELISA previamente estabelecidos com rBgP50, rBgSA1, e rBgP32. Os resultados indicaram que o rBgTRAP é um antígeno promissor no diagnóstico para a detecção de anticorpos para *B. gibsoni* em cães e que a abordagem de ELISA / PCR combinada poderia fornecer um diagnóstico mais confiável para os clínicos. Estudando a mesma proteína, Narantsatsral et al. (2011) verificaram que esta apresenta uma baixa expressão quando utilizada em alta concentração, limitando assim, o diagnóstico. Para melhorar o seu nível de expressão, a proteína BgTRAPf foi truncada em dois fragmentos tendo um N-terminal ou um C-terminal (BgTRAPn ou BgTRAPc, respectivamente). A expressão da proteína BgTRAPc em *Escherichia coli* resultou numa proteína recombinante adequada. A especificidade e sensibilidade do teste ELISA com as proteínas truncadas foram determinadas utilizando soros de cães infectados experimentalmente com *B. gibsoni* e soros de cães (SPF). Um total de 254 soros foram examinados por ELISA com rBgTRAPn, rBgTRAPc, e rBgTRAPf, bem como pelo teste de imunofluorescência de anticorpo indireto (IFAT). A especificidade do rBgTRAPc foi maior (97,15%), e o seu valor kappa (0,8003) foi maior que rBgTRAPn (0,7083). Os autores verificaram então, que com um nível suficiente de expressão, bem como uma maior especificidade e sensibilidade, rBgTRAPc parece ser um candidato potencial para o imunodiagnóstico da infecção por *B. gibsoni* em cães.

Vargas-Hernández et al. (2012) em seus estudos na Colômbia verificaram que embora a detecção molecular de *B. canis vogeli* em seus estudos tenha sido baixa (5,4%), a soroprevalência pela técnica de RIFI encontrada foi de 51,6%, indicando uma exposição anterior a este agente.

2.9.3 Diagnóstico molecular

Existem diversos métodos moleculares com suas variações e caracterizam-se pela detecção de quantidades mínimas de material genético em uma determinada amostra a ser testada. Devido às suas vantagens, tem-se sugerido o emprego destes métodos de diagnóstico na rotina clínica de pequenos animais, o que forneceria maior confiabilidade aos resultados (MOTTIN et al., 2008). No Brasil, entretanto, seu uso ainda restringe-se mais à pesquisa (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) alia especificidade e sensibilidade (BÖSE et al., 1995), proporcionando a detecção do agente em infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia (MACINTIRE et al., 2002) e ainda pode ser utilizada para validar resultados de outras técnicas de diagnóstico (BÖSE et al., 1995). Adicionalmente, esta técnica pode ser aplicada no monitoramento de terapia e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica do patógeno (PERSING et al., 1992). A PCR convencional é considerada um dos métodos de diagnóstico direto mais sensível, específico e rápido, atualmente disponível para a detecção de espécies de *Ehrlichia*, *Babesia* e *Anaplasma* caninas (IQBAL et al., 1994; ANO et al., 2001; FUKUMOTO et al., 2001; BIRKENHEUER et al., 2003; JEFFERIES et al., 2003; INOKUMA et al., 2004; DUARTE et al., 2008; PINYOOWONG et al., 2008). Sendo utilizada como teste de acompanhamento ao tratamento (PERSING et al., 1992; IQBAL et al., 1994; CHANG et al., 1997; WEN et al., 1997), na detecção de animais portadores, para caracterizar as diferentes espécies (ANDERSON et al., 1992; DAWSON et al., 1996; DUMLER et al., 2001; DUARTE et al., 2008), e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica de patógenos (PERSING et al., 1992).

Outras técnicas resultantes de modificações da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo, a nested PCR (CHANG; PAN, 1996; WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998; ANO et al., 2001; MARTIN et al., 2005), seminested PCR (BIRKENHEUER et al., 2003), PCR combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (CARRET et al., 1999; INOKUMA et al., 2001b; DAGNONE et al., 2003; JEFFERIES et al., 2007), PCR multiplex (FIGUEROA et al., 1993; ALHASSAN et al., 2005; KLEDMANEE et al., 2009; LISBÔA, 2010) e PCR em tempo real (MATSUU et al., 2005; TEGLAS et al., 2005; EDDLESTONE et al., 2006; SIRIGIREDDY et al., 2006; LABRUNA et al., 2007).

A técnica de PCR em tempo real permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Outra vantagem é que não necessita de processamento pós-PCR, ou seja, a realização da eletroforese em gel de agarose não é necessária, sendo a mesma quantitativa.

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. Um sinal de fluorescência limiar é determinado e, o ponto que detecta o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção é denominado de “Cycle Threshold” (C_T), neste ponto todas as amostras podem ser comparadas, além de permitir a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. Este limiar é calculado em função da quantidade de fluorescência base e é indicado no ponto no qual o sinal gerado da amostra é significativamente maior do que a fluorescência base. Então, o número fracionário de ciclos de PCR requeridos para gerar sinal fluorescente suficiente para alcançar este limiar, é definido como o ciclo limite, ou C_T . Os valores de C_T são diretamente proporcionais à quantidade de amostra inicial e servem como base para calcular as medidas dos níveis de expressão de RNA mensageiro ou número de cópias de DNA (GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Os sistemas mais utilizados são corantes intercalantes SYBR[®] Green (SCHMITTGEN et al., 2000; YIN et al., 2001) e as sondas: TaqMan (HEID et al., 1996) e molecular beacons (TYAGI; KRAMER, 1996). Outros métodos já foram relatados (NAZARENKO et al., 1997; WILHELM et al., 2001), entretanto, em todos os casos um sinal fluorescente é gerado durante o processo da PCR e capturado por qualquer um dos diversos instrumentos de tempo real (GINZINGER, 2002).

O SYBR[®] Green é um método de detecção não específica. Este corante se liga entre a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens de sua utilização são o baixo custo, a facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ocorrência de ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo resultar em uma superestimação da concentração do fragmento alvo. As moléculas não ligadas (ao DNA) do SYBR[®] Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo que é subtraído durante a análise de computador. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA. Para demonstrar a amplificação e avaliar se foram formados produtos de PCR inespecíficos na reação, uma curva de dissociação dos fragmentos amplificados é construída. A temperatura na qual o produto amplificado se dissocia é chamada de T_m (“melting temperature”), e a este ponto, há uma queda na fluorescência decorrente do desligamento do Sybr da fita dupla do DNA representada por um pico na curva de dissociação. Se apenas os produtos específicos da PCR forem amplificados,

um único pico será visualizado no gráfico representando assim, uma amplificação e uma Tm específica (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

2.9.4 Diagnóstico molecular em vetores

Kubelová et al. (2011) analisando carrapatos *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* na Eslováquia através de nested PCR, com posterior digestão enzimática, verificaram 3,2% de frequência de infecção por *Babesia* nos carrapatos, comprovando a subespécie *B. canis canis* em todas as amostras sendo em 3,5% das fêmeas e em 1,9% dos machos no primeiro.

Rar et al. (2005a,b) relataram frequências de 3,6% e 4,2% de positividade para *B. canis* em carrapatos *D. Reticulatus*, no sudoeste e Oeste da Sibéria, respectivamente.

Hartelt et al. (2004) estudaram doenças transmissíveis por carrapatos na Alemanha, como *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. e *Babesia* sp. enfatizando que o conhecimento sobre a prevalência destes agentes infecciosos em carrapatos é um requisito importante para a avaliação de possíveis riscos dos carrapatos como uma fonte de infecção humana na Alemanha. Para a pesquisa, ninfas e carrapatos adultos *Ixodes ricinus* foram coletados e examinados, encontrando-se *Rickettsia* sp. em 8,9% dos carrapatos examinados. Em cerca de 2,6% de carrapatos *Rickettsia*-positivos, encontraram dupla infecção com *Anaplasma phagocytophilum*. *Babesia* sp. foi detectada em 1,0% dos carrapatos examinados. Por seqüenciamento, 90 % foram identificados como *Babesia divergens*. Três dos carrapatos positivos para *Babesia* sp. foram identificados como *Babesia microti*.

Földvári et al. (2007) realizaram pesquisa na Hungria para investigar a ocorrência de espécies de carrapatos (Acari: Ixodidae) coletados de cães e *Borrelia* e *Babesia* spp. detectada nestes artrópodes. *Ixodes ricinus* e *Dermacentor reticulatus* foram as espécies de carrapatos mais comuns nos cães da área estudada. As fêmeas das duas espécies foram selecionadas para análises moleculares. Reações em cadeia da polimerase foram realizadas com primers BSLF / BSL-R para a detecção de *Borrelia* spp. em *I. ricinus* e com os iniciadores PIRO-A1/PIRO-B para amplificar DNA de *Babesia* spp. em *D. reticulatus*. Produtos foram seqüenciados para identificar as espécies, os patógenos ou subespécie. DNA de *Borrelia* spp. foi detectado em seis (5,6%) de 108 amostras de *I. ricinus* e de *Babesia* spp. em 43 (29,9%) de 144 amostras de *D. Reticulatus*. O seqüenciamento revelou uma maior similaridade com *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii* e *Babesia canis canis*, respectivamente, destacando a alta prevalência de *B. canis canis* em carrapatos coletados de cães.

Zygner et al (2008) estudaram a ocorrência e prevalência de *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, e *Anaplasma phagocytophilum* em carrapatos provenientes de cães em Varsóvia, Polônia, através de PCR. DNA de *B. canis* foi detectado em 11% dos carrapatos *D. reticulatus*. Descobriu-se que 6,2% de *I. ricinus* apresentaram DNA específico para *B. burgdorferi* e 2,9% *A. phagocytophilum*. O seqüenciamento do fragmento amplificado confirmou a infecção por *Borrelia afzelii*. Este trabalho foi o primeiro levantamento das prevalências dos agentes estudados em carrapatos.

Zygner et al (2010) observaram a ocorrência e prevalência de *Babesia microti* em carrapatos ixodídeos removidos de cães em Varsóvia (Polônia central). Dos 590 carrapatos coletados, 209 foram identificadas como *Ixodes ricinus*, e 381 como *Dermacentor reticulatus*. O DNA de *B. microti* foi detectado em 11 das 590 (1,86%) amostras de carrapatos. Quanto ao carrapato *I. Ricinus*, o DNA foi detectado somente em exemplares fêmeas (11 de 193; 5,7%). O resultado deste estudo evidenciou pela primeira vez *B. microti* em carrapatos *I. ricinus* em Varsóvia.

M'ghirbi e Bouattour (2008) pesquisaram em áreas rurais da Tunísia, *Babesia* spp. através de Hibridização PCR/RLB para detecção e análise em cães naturalmente infectados e carrapatos recuperado a partir dos cães. Das 180 amostras de sangue coletadas dos cães

domésticos em quatro aldeias situadas em diferentes zonas bioclimáticas, 12 (6,7%) foram positivas para *Babesia canis vogeli* e, de um total de 160 exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* analisados, apenas um exemplar (macho) apresentou-se infectado por *B. canis vogeli*. DNA de *Babesia* não foi detectado no sangue do cão que deu origem ao carrapato. Esta baixa frequência de infecção no carrapato foi explicada pela quantidade substancial de inibidores de PCR presentes no DNA extraído dos carrapatos. Este foi o primeiro relato sobre a detecção de DNA de *B. canis vogeli* em cães domésticos e em *R. sanguineus* na Tunísia.

Inokuma et al. (2003) em seus trabalhos de detecção e análise de espécies de *Babesia* em carrapatos recuperados a partir de cães do Japão através de diagnóstico pela PCR e análise da sequência de nucleotídeos com base no gene do rRNA 18S, verificaram e relataram pela primeira vez num total de 1.136 carrapatos (*Haemaphysalis flava*, *Rhipicephalus sanguineus*, e *Ixodes ovatus*), DNA de *Babesia canis vogeli* em seis carrapatos (dois *Haemaphysalis* sp., dois *H. longicornis*, um *H. flava* e um *R. sanguineus* e DNA de *Babesia gibsoni* Asia-1 em quatro carrapatos. Sequências únicas de 1.678 pb também foram obtidas a partir de três *Ixodes ovatus* em Províncias Akita e Fukui. As sequências foram semelhantes às de *Babesia odocoilei* (97,7%) e *Babesia divergens* (97,6%).

García-Sanmartín et al. (2008) em seus estudos, verificaram um total de 562 carrapatos ixodídeos adultos, coletados em 10 áreas de lazer montanhosas no norte da Espanha, os quais foram analisados para a infecção por piroplasmas, através de PCR/RLB utilizando um painel de sondas para 23 espécies identificadas de piroplasmas. A prevalência geral foi de 9,3%. A maioria era de *Theileria* spp. (7,7%), 3,0% *Babesia* spp. e 1,4% ambos os gêneros. *Ixodes ricinus* foi o carrapato mais abundante na vegetação, e a prevalência da infecção foi de 11,4%, *R. bursa* (16,0%) e *Haemaphysalis punctata* (13,5%). A infecção foi detectada em 6,2% de *Dermacentor reticulatus* e em 1,1% dos *Haemaphysalis inermis*. *Ixodes ricinus* transportou mais espécies de piroplasmas (13), seguido por *H. punctata* (10), *D. reticulatus* (8), *R. bursa* (3) e *H. inermis* (1). Embora a maioria dos carrapatos positivos abrigarem uma única infecção (76,9%), infecções mistas com duas ou três espécies diferentes de piroplasmas também foram detectados (23,1%). O trabalho não identificou *B. canis vogeli*, bem como exemplares de *R. sanguineus* não estiveram presentes nas coletas.

Segundo René et al. (2012), na França a babesiose canina tem uma elevada prevalência sendo *Babesia canis canis* o principal agente etiológico da doença. *Babesia vogeli* tem sido relatada na Europa e em outros países em torno do Mar Mediterrâneo. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o principal vetor conhecido de *B. vogeli*, ocorre no sul da França, no entanto, apenas um caso de cão infectado por *B. vogeli* foi relatado na França. Para obter mais conhecimentos acerca da prevalência de *Babesia* em cães e carrapatos *R. sanguineus*, foi realizado um estudo em clínica veterinária do sul da França, onde doze amostras sanguíneas de cães e 36 carrapatos *R. sanguineus* foram analisados por PCR e posterior seqüenciamento. Quatro cães (33,3%) e 8 carrapatos (22,2%) foram encontrados infectados por *B. vogeli*. Esta abordagem revelou pela primeira vez um conjunto de casos de babesiose canina causada por *B. vogeli* na França e destacou a necessidade de fazer de forma sistemática o diagnóstico de patógenos potencialmente responsáveis pela babesiose canina utilizando ferramentas moleculares adequadas.

2.9.5 Diagnóstico diferencial

A babesiose clínica pode ser confundida com outras afecções que causam febre, anorexia, letargia, anemia, hemólise, icterícia e hemoglobinúria, tornando o diagnóstico correto, de suma importância (LEATCH, 2001). A doença pode ser complicada pela presença simultânea de inclusões em monócitos por *Ehrlichia canis*, igualmente transmitida pelo

carrapato *R. sanguineus* (URQUHART et al., 1996). A co-infecção por erliquiose é um achado comum e apresenta sinais clínicos de anemia, mucosas pálidas, sinais neurológicos, dentre outros, enquanto que na babesiose há anemia, sinais neurológicos, podendo as mucosas apresentarem-se ictericas. Da mesma forma, a presença de outros hemoparasitos, como *Haemobartonella*, *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. dificultam o diagnóstico (NELSON; COUTO, 1998).

A anemia hemolítica pode ter várias causas, entre elas infecciosas, como por exemplo, micoplasmose, leptospirose, erliquiose e leishmaniose; causas tóxicas, como intoxicação por cobre; e causas imunes, por reação antígeno anticorpo, como ocorre no caso da anemia hemolítica auto-imune (KERR, 2003). Segundo Fenner (1985) pode haver anemia hemolítica devido a uma anormalidade intracorpúscular, como por exemplo, deficiência de quinase piruvato do Basenji e do Beagle, além de envenenamento por chumbo. O autor também atribui a anemia hemolítica imunomediada primariamente sem causa definida (idiopática) e secundariamente, associada a outro processo doentio (lúpus eritematoso sistêmico, linfossarcoma, leucemia linfocítica, infecções bacterianas, doença granulomatosa, doença viral, trombocitopenia imunomediada...) e secundária à administração de drogas (cefalotina, penicilina, difenilidantoína, clorpromazina, fenilbutazona, sulfonamida e dipirona).

Vale à pena ressaltar que a *Babesia canis* foi durante muito tempo confundida com *Rangelia vitalii*, recebendo a mesma denominação. Este agente etiológico foi descrito em nota preliminar à Sociedade Científica de São Paulo por Pestana em 1910, que relatou haver encontrado um piroplasma no sangue de cães que foram acometidos pela doença descrita por Carini em 1908, em cães com sintomatologia hemorrágica, conhecida vulgarmente como peste de sangue ou “Nambyuvú” (do idioma Guarani: orelha que sangra), a qual apresentava semelhança à piroplasmose por causar icterícia maligna em cães, semelhante à provocada por *Babesia canis*. Posteriormente, após estudo da doença espontânea, reproduziu-se a infecção em cães jovens através de inoculações experimentais. Ainda em 1910, Pestana identificou o agente causador deste quadro clínico como *Piroplasma vitalii* em homenagem ao Dr. Vital Brazil. As principais diferenças deste parasito e *B. canis* foram os aspectos morfológicos e biológicos, além da sintomatologia e achados macroscópicos.

Ao reavaliarem a doença, Carini e Maciel em 1914, observaram aspectos relacionados à patogenia e lesões patológicas, confirmando os achados de Pestana sobre as três formas clínicas descritas (benigna, hemorrágica e grave) e propuseram a criação de um novo gênero que denominaram *Rangelia*, em homenagem ao Dr. Rangel Pestana que tanto estudou e descreveu esta espécie detalhadamente. Essa diferenciação baseou-se principalmente na presença de esquizogonia exo-eritrocítica em células endoteliais que foram descritas detalhadamente.

Moreira (1938), em desacordo com os autores anteriores, não encontrou diferenças no quadro sintomatológico entre “Nambyuvú” e babesiose canina clássica, e admitiu de acordo com Wenyon (1926) a possibilidade de infecção mista intercorrente de *Toxoplasma gondii* e *B. canis* para as formas de esquizogonia descritas por Pestana (1910) e Carini e Maciel (1914).

Carini (1948) confirmou a existência das formas de *Rangelia* encontradas nos tecidos (esquizontes) e refutou a possibilidade de tratar-se de *Toxoplasma* ou *Hepatozoon*, assim como, detalhou a multiplicação do parasito nas células retículo-endoteliais.

Rezende (1976) descreveu a ocorrência desta parasitose em cães provenientes de áreas rurais no Rio de Janeiro com proposta de revalidação do grupo *Rangelia*, relatando a ocorrência de baixa parasitemia e de infestação dos ixodídeos: *Amblyomma aureolatum*, *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. trigrimun* e *R. sanguineus* em cães (*Canis familiaris*) provenientes destas áreas. Massard (1979) citou que neste tipo de nicho ecológico, nota-se a maior prevalência da espécie *A. aureolatum*, infestando *C. familiaris*. Posteriormente, observou-se a

relação destes ixodídeos com a presença da espécie *Hepatozoon canis* em áreas rurais (O'DWYER et al., 2001), embora a caracterização do esporocisto ocorreu na espécie *A. ovale* (FORLANO et al., 2005).

2.10 Tratamento e Profilaxia da Babesiose Canina

O tratamento da babesiose canina deve ser combinado ao suporte clínico do animal, que varia de acordo com as manifestações clínicas da doença, e com o suporte laboratorial, a fim de acompanhamento e prognóstico do tratamento.

O Dipropionato de Imidocarb é uma das drogas disponíveis para tratamento da babesiose em cães (VIAL; GORENFLOT, 2006) e apresenta efeito direto sobre o agente, alterando a forma do núcleo e a morfologia citoplasmática e interrompendo a parasitemia e os sintomas clínicos 24 a 48 horas após sua aplicação (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A quimioterapia efetiva pode ser alcançada por duas doses de 5,0-6,6 mg/kg injetadas por via subcutânea ou intramuscular, com intervalo de duas a três semanas (TABOADA, 1998). Esta droga possui efeitos colinérgicos indesejados, os quais podem ser prevenidos pela utilização de atropina (0,04 mg/kg) 10 minutos antes de sua aplicação (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). É importante considerar os benefícios do tratamento visto que, em infecção experimental, cães tratados com dipropionato de imidocarb eliminaram a infecção, mas tornaram-se mais susceptíveis à reinfecção devido à inibição da manutenção de anticorpos protetores (BRANDÃO et al., 2003). O imidocarb reduz a morbidade, mortalidade e parasitemia nas infecções por *B. gibsoni* (genótipo asiático), mas não é curativo. Esta espécie é considerada virulenta em cães e, até o momento, nenhum tratamento babesicida tem sido capaz de eliminar a infecção. Além disso, os proprietários devem estar cientes de que cães que sobrevivem à babesiose podem permanecer infectados subclínicamente e podem sofrer recidivas da doença no futuro ou servir como fonte de infecção para a propagação da doença em determinada área (TRAPP et al., 2006b).

O Aceturato de Diminazeno interfere na glicólise aeróbica e na síntese de DNA do parasita e pode ser administrado na dose única de 3,5mg/kg, via subcutânea, sendo eficaz nas infecções principalmente de filhotes, onde o dipropionato de imidocarb é contra indicado. Para *B. gibsoni* o procedimento deve ser repetido após 24 horas (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A doxiciclina na dose de até 10mg/kg, via oral, duas vezes ao dia também pode ser eficaz no controle da doença (TABOADA, 1998).

O Metronidazol administrado (25mg/kg, via oral, duas ou três vezes ao dia) durante duas a três semanas ou o Hidrocloreto de Clindamicina administrado (12,5mg/kg, via oral, duas vezes ao dia) por duas a três semanas podem diminuir a doença clínica, se outros fármacos não estiverem disponíveis. A terapia de suporte (sangue ou seus derivados, fluidos, etc.) deve ser instituída sempre que necessário, e o controle de carrapatos é fundamental na prevenção da babesiose (LAPPIN, 2006).

Estudos de Vercammen et al. (1996) demonstraram a eficácia da Doxiciclina no tratamento profilático da babesiose canina. Relataram que na dose de 5 mg/kg/dia diminuí os fortes sintomas da doença e que numa dose superior 20mg/kg/dia previne a parasitemia e a doença clínica.

Existe na Europa uma vacina contra *Babesia canis*, que é baseada em antígenos solúveis do parasita (ASP). Existem vacinas que veiculam só os ASP de uma estirpe e outras que veiculam os ASP de duas estirpes da *Babesia* spp. Quando se usa a vacina que se baseia apenas nos ASP de uma estirpe o espectro de proteção é mais estreito (SCHETTERS, 2005). Ambas as vacinas induzem proteção parcial contra a babesiose, uma vez que reduzem a gravidade dos sinais clínicos, parasitemia e duração da doença (SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011).

A vacina inativada contra babesiose canina está disponível comercialmente no Brasil, registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, sendo importada da Holanda, e chamada NOBIVAC[®] PIRO (MAPA, 2012), com a finalidade de reduzir os sinais clínicos e anemia nos animais, entretando o uso é limitado devido às diferenças antigênicas encontradas no hemoparasito envolvido de acordo com o local de ocorrência.

A profilaxia não é simples e deve ser focada no controle efetivo dos carrapatos, o que cada vez mais vem sendo dificultado, seja pelas mudanças climáticas favorecendo o ciclo do vetor, pela resistência aos acaricidas, pela falta de informação na realização do manejo ou pelo custo relativamente alto dos produtos. Quando animais de áreas endêmicas forem transportados para áreas livres, estes devem ser testados frente a testes diagnósticos e se necessário tratados anteriormente (HUXSOLL et al., 1970). Cães doadores de sangue devem passar por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

2.11 Saúde Pública

A babesiose é uma zoonose emergente em muitas partes do mundo, no entanto, com algumas exceções, as babesias características dos animais de companhia não estão implicadas na transmissão zoonótica (IRWIN, 2009). Aparentemente não existe nenhuma babesia que tenha como hospedeiro específico o homem, e este quando afetado é considerado um hospedeiro acidental. A doença que apresenta é normalmente ligeira, auto-limitante ou facilmente tratável, doença severa é extremamente rara (TABOADA; LOBETTI, 2006). A babesiose humana torna-se mais importante nos indivíduos imunocomprometidos e deve ser considerada no diagnóstico diferencial de infecção ou de febre de origem desconhecida especialmente em pacientes esplenectomizados, que receberam transfusão sanguínea ou portadores do vírus da AIDS (HUNFELD et al., 2008). Já foi relatado caso de babesiose humana devido *B. canis*, com sintomatologia renal aguda (TABOADA; LOBETTI, 2006). Porém deve-se ter em conta, que os cães expõem os humanos a vetores, que muitas vezes veiculam organismos que podem afetá-los mais severamente (TABOADA; LOBETTI, 2006).

Embora *B. microti* seja responsável pela maioria dos casos de babesiose humana nos Estados Unidos, existem relatos na literatura de *B. divergens* como o agente da babesiose humana neste país (SKOTARCZAK; CICHOCKA, 2001). Casos de babesiose humana em Washington e Califórnia estão relacionados com uma espécie desconhecida designada WA-1. Estudos filogenéticos demonstraram que WA-1 está relacionada com *Babesia gibsoni* (parasita canino). Um caso fatal de babesiose humana foi descrito no Missouri a partir de uma cepa denominada MO-1, relacionada à *B. divergens* (FRIEDMAN et al., 2004).

Entre os anos de 1982 e 1993, 139 pacientes que estavam hospitalizados com babesiose no Estado de Nova Iorque, nove pacientes morreram (6,5%) e os sintomas mais comuns foram febre, mialgia, dor de cabeça, fadiga, fraqueza, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria. Entre estes pacientes, 12% tinham histórico de doença de Lyme, 12% eram esplenectomizados e 2% contraíram a doença por transfusão sanguínea (WHITE et al., 1998).

Na Europa já foram relatados casos e todos envolveram as espécies *Babesia microti* e *B. bovis* e ocorreram em indivíduos que foram esplenectomizados. O primeiro caso de babesiose humana na Europa ocorreu em um fazendeiro de 33 anos, esplenectomizado, com sintomas de febre, anemia, calafrios e hemoglobinúria. A espécie *B. bovis* foi identificada no sangue do paciente (YOSHINARI et al., 2003). O primeiro caso de Babesiose humana na Polônia foi diagnosticado sendo importado do Brasil e baseado na descoberta do parasita, depois de uma inoculação intraperitoneal do sangue do paciente em hamster. A espécie não foi identificada neste caso (HUMICZEWSKA; KUZNA GRYGIEL, 1997). Cerca de 20 casos de babesiose humana ocasionados por transfusão de sangue foram descritos desde 1980, no Japão (MATSUI et al., 2000; SAITO-ITO et al., 2000) e no Canadá (BUJASSOUM et al.,

2000). O risco de infecção por transfusão sanguínea é estimado de 6 por 1 milhão em sangue coletado (MCQUISTION et al., 2000). Confusões clínicas entre babesiose humana e malária são freqüentemente descritas na literatura (CLARK; JACOBSON, 1998). Dor de cabeça, febre, náuseas, vômito, mialgia, estado mental alterado, coagulação intravascular disseminada, anemia com destruição de eritrócitos, hipertensão, angústia respiratória e insuficiência renal são sintomas comuns para ambas doenças.

Segundo Alecrim et al. (1983), o primeiro registro de babesiose humana no Brasil foi registrado no Estado de Pernambuco em um paciente de sexo masculino, auxiliar de veterinário e trabalhador numa fazenda. O paciente apresentou sintomas como febre, indisposição, inapetência e dores pelo corpo, foi internado, e durante a hospitalização foi tratado como portador de malária, sem obter melhora, contudo após análise parasitológica detalhada, foram observadas estruturas parasitárias identificadas como *Babesia* spp. O trabalho de Yoshinari et al. (2003) reportou um caso de co-infecção causada por patógenos da doença de Lyme e babesiose em dois irmãos que contraíram a doença na cidade de Cotia, Estado de São Paulo, em 1992. Os mesmos autores também observaram alta freqüência (25,4%) de anticorpos para *B. bovis* em um grupo de 59 pacientes brasileiros com borreliose de Lyme.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Região Estudada

O estudo foi realizado no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. O município localiza-se na Microrregião de Itaguaí (composta por três municípios: Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba) e faz parte da mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro a 75 quilômetros da capital do Estado. Ocupa uma área de 283,794 km², e sua população foi estimada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) no ano de 2010, em 78.138 habitantes, sendo então o 31º município mais populoso do Estado e o segundo mais populoso de sua microrregião. Apresenta limites com os municípios Itaguaí, Nova Iguaçu, Japeri, Queimados e Paracambi. Localiza-se a 22° 44' 38" de latitude Sul, 43° 42' 28" de longitude Oeste, na região Oeste da Baixada Fluminense a uma elevação de 26 metros do nível do mar (IBGE, 2010). (Figura 1)

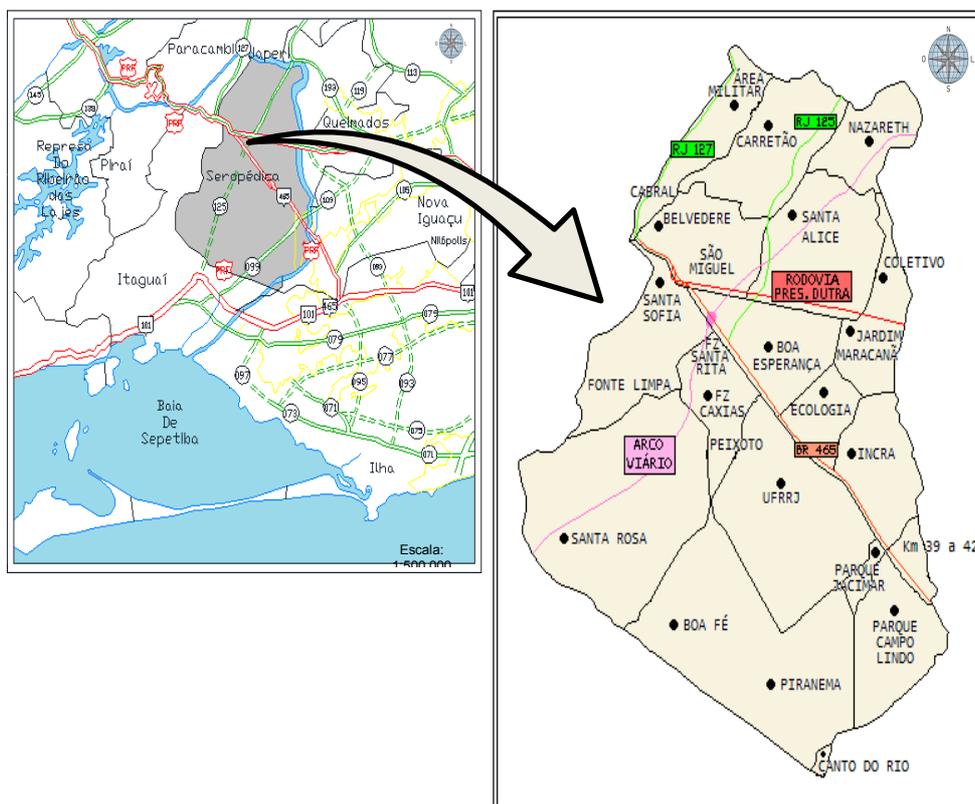


Figura 1. Localização geográfica do município de Seropédica, Rio de Janeiro, evidenciando os bairros e as principais rodovias federais e estaduais existentes, e o Arco Viário que está sendo implementado na região. Adaptado do DNIT (Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes) por Silva, C. S e Silva, J. M. (2012).

A temperatura média anual da região é de 22,7 °C, com temperatura média máxima acima de 25°C e precipitação anual de 1.291,7 mm. O clima é tropical subúmido com pouco ou nenhum déficit hídrico e mesotérmico com calor bem distribuído o ano todo. É classificado como Aw (tropical com estação seca e estação chuvosa no verão) segundo o modelo de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007).

O município apresenta áreas urbanizadas e expansão da urbanização para as áreas rurais, com pequena extensão territorial entre as mesmas e facilidade de deslocamento de pessoas e animais entre essas áreas. As áreas rurais apresentam certo grau de influência da urbanização em relação às edificações e hábitos de criação de animais de companhia, porém com características ambientais, sociais, econômicas e demográficas que as caracterizam como rurais. Esta característica quanto ao tipo de área é observada em toda a região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

O trabalho de coleta de material biológico foi realizado em diferentes localidades rurais e urbanizadas dentro do município de Seropédica, listados a seguir: Km 42, Km 39, Boa Esperança, Km 49 (Centro), Fazenda Caxias, Fonte Limpa, Mutirão, Eldorado, Peixoto, Sá Freire, Santa Sofia, Vila Sônia, Km 47 (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ), Areal, São Miguel e Valão da Louça.

3.2 Inquérito Canino

3.2.1 Tamanho da amostra e amostragem

Para a determinação do tamanho da amostra foi estabelecido o grau de confiança de 95%. Visto não terem sido realizados estudos de prevalência por outros grupos de pesquisa na região, com os métodos de diagnóstico utilizados no presente estudo, a prevalência esperada utilizada para o cálculo foi de 40%, baseada na prevalência encontrada pelo método de diagnóstico sorológico de RIFI em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro (O' DWYER, 2000). A margem de erro admitida para este valor foi de 6%.

Desta forma, para estabelecer o número mínimo de amostras para coleta na microrregião de Itaguaí, seguiu-se a equação descrita por Sampaio (2002):

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

Após a aplicação da fórmula, foi estabelecida uma coleta de no mínimo 256 amostras caninas no município de Seropédica, RJ.

3.2.2 Visita às residências e aplicação do questionário epidemiológico

O princípio da amostragem foi por conveniência não probabilística, realizando-se o estudo nas propriedades rurais e urbanas com presença de cães e cujos proprietários estiveram de acordo com a realização do trabalho. Em cada propriedade visitada, foi explicado ao proprietário o objetivo do estudo, juntamente à conscientização da necessidade deste tipo de trabalho, elucidando sobre as doenças que possivelmente podem acometer seus animais e a si próprios. Um termo de livre consentimento foi assinado por cada proprietário e pelo pesquisador, dispondo-se também de telefone e e-mail do pesquisador para contato. Após o consentimento, foi aplicado um questionário semi-estruturado (Anexo A) na forma de entrevista, como instrumento de investigação dos possíveis fatores de risco associados com a transmissão dos hemoparasitos estudados, visando recolher informações inerentes aos proprietários (dados pessoais, endereço, escolaridade, condição financeira, entre outros), às condições ambientais (características do ambiente, métodos profiláticos contra vetores, etc.) e

ao animal (manejo sanitário, história pregressa, sexo, idade, raça, porte, pelagem, pêlo, hábitos do animal, contato com outras espécies, alterações clínicas, entre outras). As informações adquiridas a partir das questões pré-estabelecidas foram tabuladas a fim de avaliar possíveis fatores associados à sororreatividade de cães à babesiose canina.

3.2.3 Coleta de material biológico (sangue) e ectoparasitos dos cães

Após o consentimento do proprietário ou responsável, os animais foram adequadamente contidos e submetidos aos exames clínicos. Após avaliação clínica, explicou-se para os proprietários sobre a saúde dos animais e realizou-se a prescrição quando necessária. Foram coletadas amostras sanguíneas e ectoparasitos dos cães. O número total de amostras sanguíneas coletadas foi de 311, no período de janeiro de 2010 à janeiro de 2011. Duas amostras de aproximadamente 5 mL de sangue periférico foram coletadas de cada animal através de punção da veia cefálica, e acondicionadas uma em tubo sem anticoagulante (para obtenção do soro) e outra em tubo com anticoagulante (para obtenção de sangue total), sendo devidamente identificados e mantidos em recipiente térmico até a chegada ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para serem submetidas às análises. As amostras dos tubos sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação a 2500xg por 5 minutos, para separação dos soros, os quais foram aliquotados em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificados e acondicionados a -20°C até o momento da realização dos ensaios sorológicos. As amostras dos tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) foram homogeneizadas por inversão lenta e submetidas à análise utilizando-se contador automático de células. Dos tubos contendo anticoagulante, foram aliquotados a capa leucocitária e cerca de 2mL de sangue total, acondicionados em microtubos de polipropileno de 2 mL e mantidos a -20°C até o momento da realização da extração de DNA e posterior diagnóstico molecular. Os exemplares de ectoparasitos dos cães foram coletados manualmente após inspeção visual e palpação na superfície corporal do cão, e em seguida, acondicionados em frascos contendo álcool isopropílico para posterior identificação e utilização de diagnóstico através de ferramentas moleculares.

3.2.4 Local de realização das análises laboratoriais

As análises para avaliação parasitológica através de esfregaço sanguíneo (por microscopia óptica), identificação dos ectoparasitos, avaliação hematológica, extração de DNA das amostras sanguíneas e de carrapatos, quantificação de DNA, PCR, verificação de sensibilidade e especificidade das reações, eletroforese em gel de agarose e PCR RFLP foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Hemoparasitos e Vetores da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A orientação para a condução das análises moleculares foi gentilmente realizada pelo professor Huarrisson Azevedo Santos (UFRRJ).

O diagnóstico pela PCR em tempo Real foi realizado no Instituto de Agronomia da UFRRJ, no Departamento de Solos, sob a orientação do professor Leandro Azevedo Santos (UFRRJ).

As análises sorológicas foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP, e a condução das análises sob a gentil orientação das professoras Cristiane Divan Baldani (UFRRJ) e Rosângela Zacarias Machado (UNESP).

3.3 Avaliação Hematológica

Para avaliação hematológica, as amostras de sangue de cada cão foram colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e submetidas à análise pelo contador automático de células (ABC VET, Horiba ABX). A contagem diferencial de células brancas foi realizada por microscopia óptica, através de análise de esfregaços sanguíneos. Os sólidos totais foram determinados através de refratometria (COLES, 1984).

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: volume globular (VG), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (He), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (ADH), número de plaquetas (PLA), volume plaquetário médio (VPM), leucometria global (LG), número de linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GRA).

3.4 Avaliação Parasitológica através de Esfregaço Sanguíneo

De cada amostra sanguínea de cão foram feitos dois esfregaços sanguíneos, os quais foram identificados, secos em temperatura ambiente e fixados em álcool metílico puro para análise, durante 3 minutos. Em seguida foram corados pelo método de Giemsa (1:10) por 45 minutos em temperatura ambiente. Os esfregaços corados foram examinados em microscópio óptico com objetiva de imersão de 100x e ocular de 10x.

3.5 Identificação dos Ectoparasitos

Todos os animais foram inspecionados visualmente por todo o corpo, para observação do ectoparasitismo. Nos animais parasitados, o grau de infestação foi categorizado da seguinte forma: infestação baixa (< cinco exemplares), infestação moderada (\geq cinco<15) e infestação alta (\geq 15). Os ectoparasitos coletados dos cães foram acondicionados em tubos contendo álcool isopropílico para preservação. Em seguida os exemplares foram identificados em microscópio estereoscópico em nível de espécie utilizando a chave dicotômica de Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Batestti et al. (2006) para identificação dos carrapatos. Os estágios ninfais dos carrapatos do gênero *Amblyomma* foram identificados pela chave de identificação taxonômica para ninfas, segundo Martins (2009) e as larvas identificadas em nível de família.

3.6 Análise Sorológica

As amostras de sangue coletadas em tubos sem anticoagulante foram devidamente identificadas e mantidas em refrigeração. Após a retração do coágulo, o tubo foi centrifugado a 2500xg por 5 minutos sendo então retirado o soro utilizando-se pipeta automática. Os soros foram acondicionados em microtubos de polipropileno de 1,5 ml, devidamente identificados e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da análise sorológica. Os exames sorológicos foram processados frente a antígenos específicos e padronizados para *Babesia canis*, na concentração de 5 µg/mL. Para a pesquisa de anticorpos da classe IgG foi utilizada a técnica imunológica de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção enzimática) com protocolo descrito por Furuta (2004), que mencionou que o ensaio consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados, que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas, onde são adicionados devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, onde as que possuem anticorpos específicos se fixam aos antígenos. Foi realizada a padronização prévia da técnica imunológica utilizada para a

espécie. Os antígenos utilizados foram os produzidos por infecção experimental em cão esplenectomizado proveniente do laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP. Como soros de referência positivos, foram empregados os de cães previamente diagnosticados pela RIFI e de cães com diagnóstico positivo e alta carga parasitária à microscopia óptica; os de referência negativos consistiam de amostra de soro de cães recém-nascidos, antes da ingestão de colostro e filhos de cadela livre do patógeno. Os soros teste foram diluídos a 1:50. O Conjugado utilizado foi Sigma anti-dog IgG Alkaline Phosphatase Conjugate, na diluição 1:2000. A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 405 nm (Anexo B).

3.7 Extração de DNA de Amostras de Sangue Total e Carrapatos

A extração do DNA total foi realizada a partir de 200µL de sangue total através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega[®], Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante com pequenas adaptações. O DNA extraído foi quantificado, aliquotado em microtubos de polipropileno de 0,6mL estéreis, identificados e armazenados a -20° C, para posterior utilização na PCR (Anexo C).

Quanto aos carrapatos, em uma etapa anterior à extração de DNA, os carrapatos identificados foram separados de acordo com a sua espécie, sexo, estágio evolutivo, animal de origem, data da coleta e localidade de procedência. O material genômico dos carrapatos adultos foi extraído a partir de um único exemplar, o DNA das ninfas foi extraído a partir de um “pool de carrapatos” de cinco exemplares. A extração de DNA dos carrapatos foi realizada de acordo com o protocolo utilizado na extração de DNA em plantas proposto por Ferreira; Grattapaglia (1998) com pequenas modificações (Anexo D). O número total de carrapatos submetidos à extração foi de 240 exemplares.

3.7.1 Quantificação e pureza das amostras de DNA

A determinação da concentração e pureza do DNA total de todas as amostras de capa leucocitária e carrapatos foi realizada através de espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Cientific). Todas as amostras de DNA foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 30ng/µL.

3.7.2 Obtenção dos controles positivos

As amostras de DNA de *Babesia canis vogeli* foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares da Universidade Federal de Goiás.

3.8 PCR em Tempo real das Amostras de DNA de Sangue de Cão e Carrapatos para Diagnóstico de *Babesia* spp.

As amostras de DNA de sangue e carrapatos dos cães foram submetidas à PCR em tempo real para a amplificação de um fragmento específico de aproximadamente 71 pb do gene 18S rRNA das espécies do gênero *Babesia*. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores *Babesia* Real-F (5'-CTTTTGACCGCGTTTATTAGTTTG-3') e *Babesia* Real-R (5'-TGCGATTCCGCCAGTTTATTATG-3) (LISBÔA, 2010). Todas as reações foram realizadas em volume final de 12µL, contendo: 6µL 1X Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 900nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3µL (aproximadamente 90ng) de DNA total. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação. O programa de amplificação foi composto por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos,

seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e um passo de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação foi acrescentada para verificar a especificidade da amplificação. Foram consideradas positivas amostras com limiar de detecção (C_T) inferior a 35 ciclos, cujo produto amplificado apresentou a mesma temperatura de dissociação do controle positivo. O produto da PCR das reações positivas foi submetido à eletroforese em Gel de Agarose a 2% e corado com brometo de etídio para confirmação da amplificação do fragmento de tamanho esperado.

3.8.1 Sensibilidade e especificidade analítica da PCR utilizando o sistema SYBR Green para detecção da amplificação de *Babesia* spp.

A sensibilidade analítica do ensaio foi determinada pela avaliação de diluições decimais seriadas do amplicon clonado em plasmídeo pGEM-T (BELL; PATEL, 2005). A sensibilidade da PCR em tempo real foi avaliada com e sem a adição de 1µL de DNA extraído de sangue total de um cão não infectado para o diagnóstico de *Babesia* spp. em amostras de DNA de sangue de cão. Da mesma forma, adicionou-se 1µL de DNA total extraído de carrapatos procedentes de colônia mantidas em coelhos no laboratório e livres de hemoparasitos para verificar a sensibilidade da técnica utilizando amostras de DNA total de carrapatos. A concentração e pureza do DNA plasmidial foram mensuradas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c -Thermo Scientific). A concentração do DNA plasmidial serviu de base para o cálculo do número de plasmídios. Para determinar a sensibilidade analítica da PCR em tempo real baseada na detecção pelo SYBR green foi confeccionada uma curva com sete pontos, plotando o número de cópias do plasmídeo pelos valores de C_T . O número de cópias variou de 3×10^6 a apenas três, e seis diluições separadas foram realizadas para cada ponto na curva. Uma curva de dissociação também foi adicionada ao final desse ensaio para verificar a especificidade e certificar a eficiência dos *primers*.

A especificidade da reação foi avaliada utilizando DNA de organismos relacionados e outros patógenos transmitidos por carrapatos, como: *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii*, *Hepatozoon canis*, *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

3.8.2 Medidas para verificação de contaminações nas reações

Para verificar eventual contaminação dos reagentes e enzimas, dois controles contendo todos os componentes da PCR, com exceção da amostra de DNA, foram incluídos em cada reação. A amostra de DNA foi substituída por uma quantidade equivalente de água ultrapura. Ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as fases do experimento, e os procedimentos de extração de DNA e reações de PCR foram realizados em salas separadas. Todas as reações de PCR foram realizadas em sistema fechado.

3.9 PCR RFLP para Diferenciação das Três Subespécies de *Babesia canis* (*Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*)

As amostras positivas na PCR em tempo real foram novamente submetidas a amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A 5'-AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3' e PIRO-B 5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3' (FÖLDVÁRI et al., 2005) que amplificam 450pb do gene 18S rRNA. As reações foram realizadas em volume final de 25µL, contendo: 12,5 µL GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega Corporation®, Madison, USA), 0,3µM de cada "primer", 3 µL de DNA total (aproximadamente 90ng) e água ultra pura na quantidade suficiente para completar o volume

final. O programa de amplificação foi composto por um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos: 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 30s e um passo de extensão final a 72 °C por 5min.

As amostras positivas amplificadas na PCR (os produtos da PCR) foram submetidas à restrição, utilizando-se as enzimas de restrição *Hinf* I e *Taq* I (Promega Corporation®, Madison, USA), para distinção das subespécies de *B. canis* de acordo com o perfil de digestão. Para a técnica, foram utilizados para cada amostra, cerca de 1/5 (8 µL) de cada produto amplificado, 10 U de *Hinf* I e 10 U de *Taq* I em seus apropriados tampões, digerindo por 3 horas a 37°C e 65°C, respectivamente (CARRET et al., 1999). Os produtos digeridos foram visualizados em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. O quadro 2 mostra o perfil de clivagem pelas enzimas com base nos estudos de Solano-Galego et al. (2008).

Quadro 2. Resultados esperados dos tamanhos dos fragmentos de DNA (pb) na PCR e restrição enzimática utilizando as enzimas *Taq* I e *Hinf* I.

Espécies	Tamanho aproximado do fragmento de DNA (pb)	Restrição Enzimática		
		<i>TAQI</i> (pb)	<i>HINF</i> I (pb)	CLIVAGEM
<i>B. canis canis</i>	408	408	408	<i>TAQI</i> (-) <i>HINF</i> I (-)
<i>B. canis vogeli</i>	407	20 + 175 + 210	407	<i>TAQI</i> (+) <i>HINF</i> I (-)
<i>B. canis rossi</i>	408	408	175 + 230	<i>TAQI</i> (-) <i>HINF</i> I (+)

(+) ocorre clivagem (-) não há clivagem

3.10 Análise Estatística

Os resultados do diagnóstico pelo método sorológico de ELISA em cães foram associados através do teste Qui-quadrado ou quando necessário, o teste exato de Fisher em nível de 5% de significância com as variáveis obtidas através do questionário epidemiológico. Os valores médios dos parâmetros hematológicos obtidos de cães infectados e não infectados por *Babesia canis* foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, comparados pelo teste F seguido pelo teste *t* de student em nível de 5% de significância, quando os dados apresentaram distribuição normal; quando os dados em questão apresentaram distribuição não normal, foi utilizado o teste Mann Whitney, a 5% de significância. A frequência das alterações hematológicas no grupo de cães infectados e não infectados foi comparada através do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado em nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2000).

3.11 Princípios Éticos

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela COMEP/UFRRJ (Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ) informando que este projeto de pesquisa que está sob o processo 23083.006049/2011-60, atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais (Anexo E). Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos Epidemiológicos de *Babesia canis* em Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ.

4.1.1 Diagnóstico pela técnica direta de esfregaço sanguíneo a partir de amostras de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ

Ao exame microscópico do esfregaço sanguíneo dos 311 cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica observaram-se as seguintes frequências: 6,11% (n=19/311) dos cães parasitados com *Ehrlichia canis*, 3,22% (n=10/311) por *Anaplasma platys*, 1,93% (n=6/311) por *Hepatozoon canis*, 0,96% (n=3/311) por *Babesia canis* (Figura 2), e 0,32% (n=1/311) por *Dirofilaria immitis*. Dentre os cães avaliados, as frequências de co-infecções foram: 0,32% (1/311) estava co-infectado por *B. canis* e *E. canis*, 0,32% (n=1/311) co-infectado por *A. platys* e *E. canis*, 0,32% (n=1/311) por *E. canis* e *H. canis* e 0,32% (n=1/311) por *A. platys*, *B. canis* e *E. canis*.

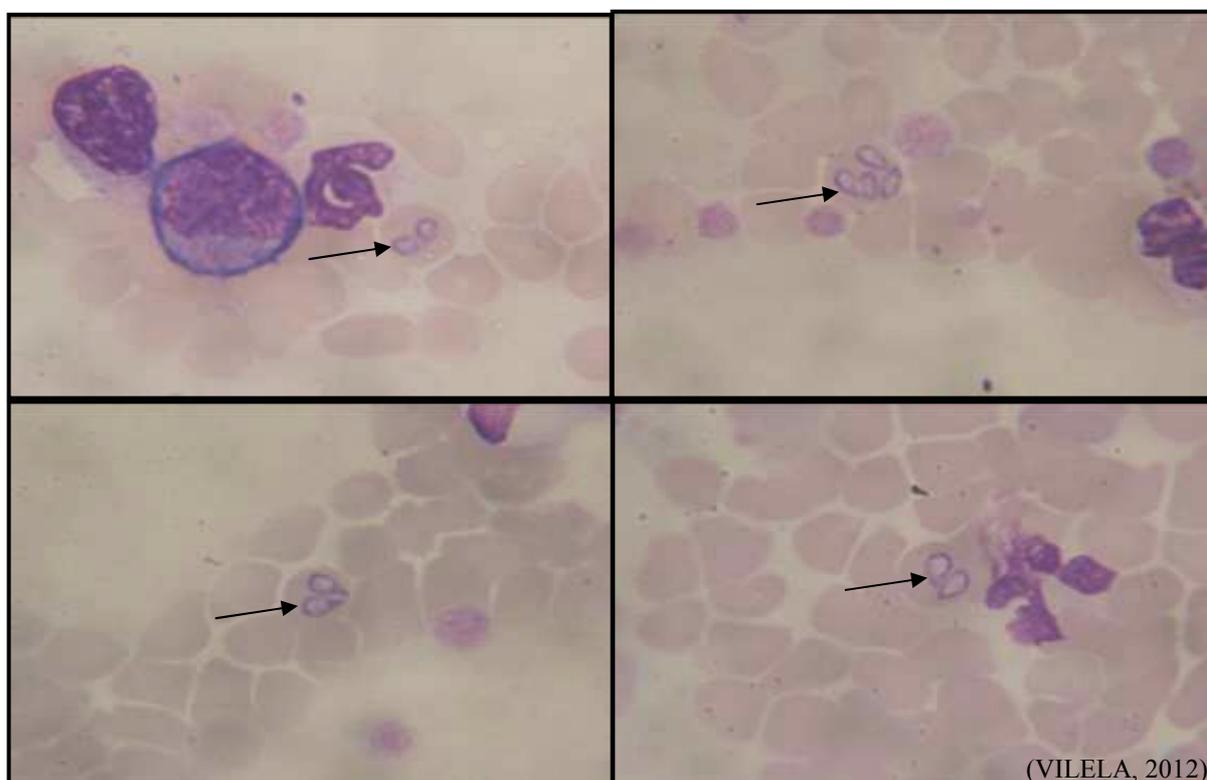


Figura 2: Trofozoítas de *Babesia canis* em eritrócitos de cão (seta). Esfregaço sanguíneo corado pelo método de Giemsa diagnosticado por microscopia óptica. Cães de Seropédica, RJ, Brasil.

4.1.2 Avaliação do ectoparasitismo em cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ

Do total de 311 cães avaliados, foram observadas infestações por ectoparasitos (carrapatos, pulgas, piolhos, sarnas e bernes) em 252 (81,03%) cães no momento da coleta. Destes, 70,64% (n=178/252) apresentaram-se infestados por carrapatos, 38,89% (n=98/252)

por pulgas, 5,16% (n=13/252) por sarnas, 2,78% (n=7/252) por piolhos e 5,95% (n=15/252) por bernes (Figura 3).

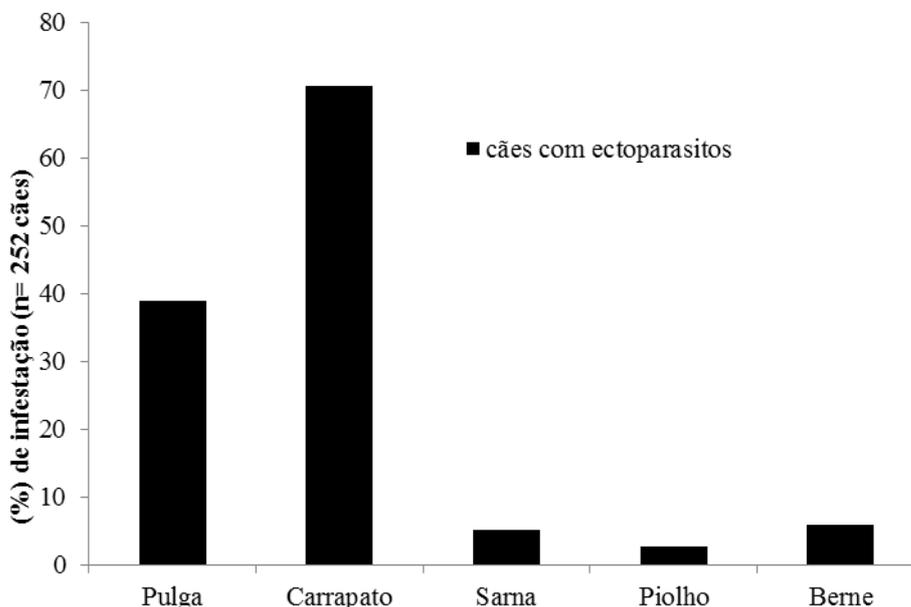


Figura 3. Percentual de espécimes de ectoparasitos em cães infestados (n=252) de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ.

O parasitismo por carrapatos ocorreu em 57,24% (n=178/311) dos cães avaliados. Quanto ao grau de infestação por carrapatos, foi verificado que 53,93% (n=96/178) dos cães estavam infestados com menos de cinco carrapatos (infestação baixa), 27,53% (n=49/178) com cinco a 14 carrapatos (infestação moderada), 18,54% (n=33/178) com 15 ou mais carrapatos (infestação alta). Em relação à infestação por carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus* foi encontrado em 68,54% (n=122/178) dos cães, *Amblyomma cajennense* em 11,80% (n=21/178), *A. ovale* em 3,37% (n=6/178) e *A. dubitatum* em 0,56% (n=1/178) dos cães infestados por carrapatos. Ninfas de *R. sanguineus* e *A. cajennense* foram observadas em 13,48% (n=24/178) e 5,62% (n=10/178) dos cães infestados por carrapatos, respectivamente (Figura 4).

O número total de exemplares de ectoparasitos identificados foi de 1490 espécimes. Dos 178 cães infestados por carrapatos, 123 (69,10%) pertenciam a domicílios localizados em áreas rurais e 55 (30,90%) a domicílios urbanos.

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* foram observados em sua maioria em cães domiciliados em áreas rurais do município de Seropédica, tendo somente um cão de área urbana com uma ninfa do gênero. A frequência de cães infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma* em domicílios rurais foi de 47,96% (n=60/123) diferindo significativamente ($p<0,0001$) das áreas urbanas. Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados em cães de áreas rurais (60,16%, n=74/123) e urbanas (87,27%, n=48/55).

A frequência de cães parasitados por *R. sanguineus* diferiu significativamente ($p=0,0006$) entre os cães domiciliados em áreas urbanas e em áreas rurais, tendo maior frequência na área urbana (87,27%, n=48/55) que na área rural (60,16%, n=74/123). *Amblyomma* sp. e *R. sanguineus* foram encontrados simultaneamente em 6,50% (n=8/123) dos cães domiciliados em áreas rurais.

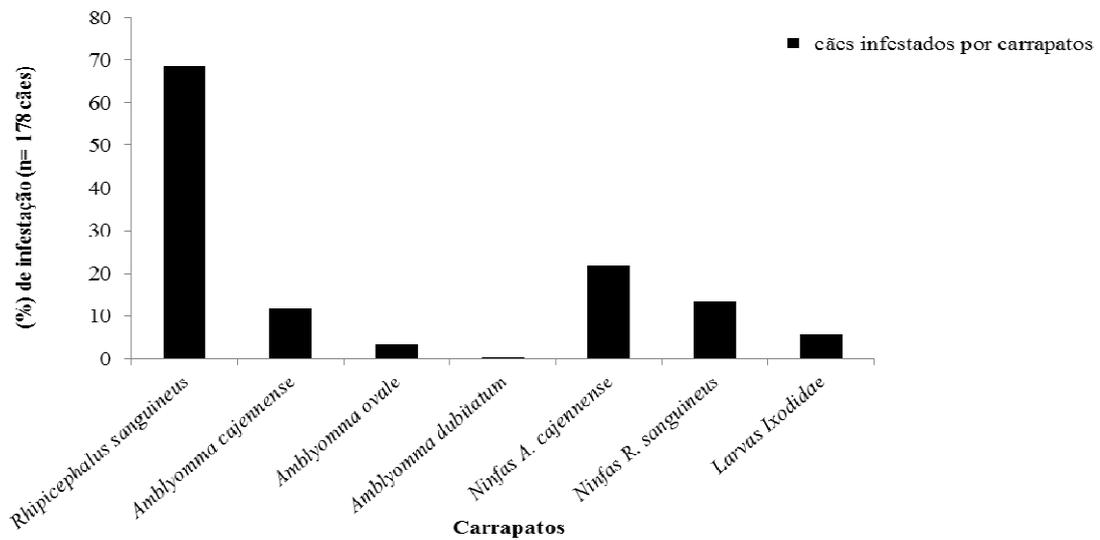


Figura 4. Frequência de cães infestados por carrapatos (n=178) de áreas rurais e urbanas no município de Seropédica, RJ.

Para os demais carrapatos foram encontradas as seguintes frequências para os meios rural e urbano, respectivamente: *Amblyomma ovale* (4,88%), *A. dubitatum*, (0,81%), ninfas de *A. cajennense* (30,89% e 1,82%), ninfas de *R. sanguineus* (8,94% e 23,64%) e larvas Ixodidae (8,13%) (Figura 5).

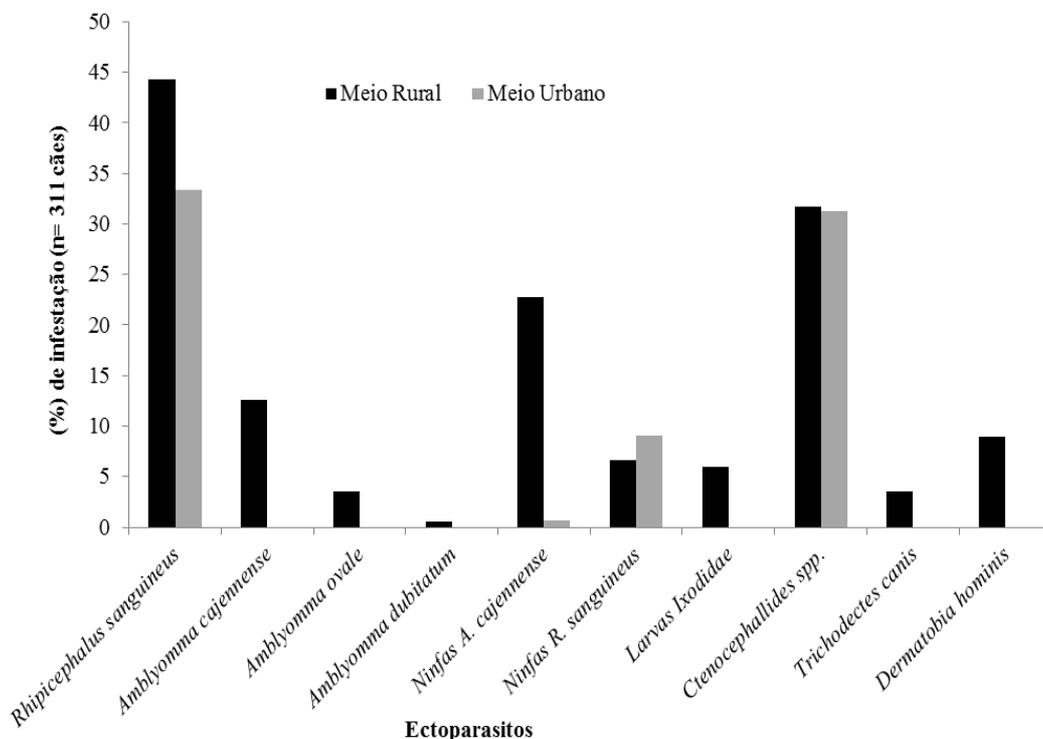


Figura 5. Frequência de infestação por ectoparasitos (n=311) em cães de áreas rurais e urbanas no município de Seropédica, RJ.

A variável estação do ano foi verificada para o estudo, sendo as seguintes: Primavera (de 23 de setembro a 20 de dezembro), Verão (de 21 de dezembro a 19 de março), Outono (de 20 de março a 20 de junho) e Inverno (de 21 de junho a 22 de setembro). Dentre as variáveis estações do ano e comparação com a presença ou ausência de infestação por carrapatos observados nos cães durante o estudo pôde-se verificar associação ($p < 0,05$) entre a presença de infestação por carrapatos e o período do inverno. A primavera e o verão não apresentaram diferenças quanto à infestação. O percentual de infestação por carrapatos foi acima de 52% e esteve presente durante todas as estações do ano (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de infestação por carrapatos em cães do município de Seropédica, RJ, em função de características inerentes à estação do ano.

Variável	Infestação por carrapatos			Total
	Presença	%	Ausência	
Estação do ano				
Inverno	13	86,67 ^a	2	15
Outono	52	60,47 ^{ab}	34	86
Verão	45	56,25 ^b	35	80
Primavera	68	52,31 ^b	62	130
Total ($p = 0,0236$)	178	57,23	133	311

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Dentre as variáveis estações do ano e comparação com o grau de infestação por carrapatos observado nos cães durante o estudo pôde-se verificar associação ($p < 0,05$) entre a alta infestação por carrapatos e o período do verão. A primavera e o outono não apresentaram diferenças entre o grau de infestação. Os graus de infestação baixo e moderado não apresentaram diferença entre as estações do ano ($p > 0,05$). Independente do grau, a infestação por carrapatos foi observada durante todas as estações do ano (Tabela 2).

Tabela 2. Grau de infestação por carrapatos em cães do município de Seropédica, RJ em função de características inerentes à estação do ano.

Variável	Grau de infestação por carrapatos						Total
	Baixo		Moderado		Alto		
Estação do ano	n	%	n	%	n	%	n
Inverno	9	69,20 ^a	4	30,80 ^a	0	0,0 ^b	13
Outono	34	65,40 ^a	11	21,20 ^a	7	13,50 ^b	52
Primavera	36	52,90 ^a	21	30,90 ^a	11	16,20 ^b	68
Verão	17	37,80 ^a	13	28,90 ^a	15	33,30 ^a	45
Total ($p = 0,0140$)	96	53,93	49	27,53	33	18,54	178

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t em nível de 5% de confiança.

4.1.3 Diagnóstico de *Babesia canis* através de diagnóstico indireto pela técnica sorológica de ELISA (Ensaio Imunoenzimático de Adsorção) a partir de amostras séricas de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ

No presente estudo foram avaliados 311 cães, sendo 167 ($n=53,7\%$) de área rural e 144 ($n=46,3\%$) de área urbana) para o diagnóstico sorológico de *Babesia canis*, através do teste de ELISA, encontrando-se um total de 39 cães (12,54%) sorologicamente positivos para o agente, com frequência de positividade de 21,56% ($n=36/167$) nos cães de área rural e

2,08% (n=3/144) nos cães de área urbana, sendo a área rural, a que apresentou maior soropositividade para o agente estudado (p<0,0001).

4.1.4 Fatores associados com o resultado positivo através de diagnóstico pelo método sorológico de ELISA para *Babesia canis* em cães domésticos

Com o objetivo de determinar os possíveis fatores epidemiológicos associados com o resultado positivo pelo método de ELISA para *Babesia canis* em cães de áreas rurais e urbanas, as informações obtidas por meio de questionário epidemiológico foram relacionadas com o diagnóstico sorológico para os cães. Com relação à época do ano, foram observadas associações entre a soropositividade e a estação do ano. Foi verificado maior percentual de positividade (p<0,005) para *Babesia canis* nos meses relacionados ao outono (27,91%) (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de cães positivos para *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ, diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), em função de características inerentes à estação do ano.

Variável	Diagnóstico por Elisa			Total
	Positivo	%	Negativo	
Estação do ano				
Outono	24	27,91 ^a	62	86
Inverno	3	20,00 ^{ab}	12	15
Primavera	8	6,15 ^b	122	130
Verão	4	5,00 ^b	76	80
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.1.5 Fatores associados às características dos cães domésticos com diagnóstico positivo pelo método sorológico de ELISA para *Babesia canis*

No presente estudo foram avaliados 311 cães para o diagnóstico sorológico de *Babesia canis*, sendo encontrado um total de 39 cães (12,54%) sorologicamente positivos para o agente. As variáveis relacionadas com o hospedeiro e seu histórico clínico que apresentaram associação (p<0,05) com a positividade na sorologia pelo método de ELISA foram: área de residência, sendo a área rural a que apresentou maior frequência (92,31%, n=36/39); quanto à definição racial, animais sem raça definida apresentaram maior soropositividade (87,18%, n=34/39) do que cães com raça definida, constituindo 72,03% da população estudada; as raças positivas para *Babesia canis* foram: três Poodles, um Doberman e um Pastor Americano; a idade de maior frequência de soropositividade foi entre seis meses e dois anos (20,59%, n=14/68) e não foram observados cães positivos entre aqueles com faixa etária inferior a seis meses (6,11% da população); A presença de carrapatos foi observada em 57,23% (n=178/311) dos cães, tendo os animais soropositivos (16,85%, n=30/178), maior infestação por carrapatos (76,92%, n=30/39).

Dentre as variáveis analisadas pelo questionário não foi verificada associação (p>0,05) entre as variáveis: sexo, comprimento do pêlo, porte do animal, infestação por ectoparasitos, tratamento carrapaticida e histórico de doenças causadas por agentes etiológicos transmitidos por carrapatos com o resultado positivo na sorologia. Em relação ao sexo, observou-se um maior percentual de cães machos positivos quando comparados com as fêmeas, com 15,72% (n=25/159) dos machos e 9,21% (n=14/152) das fêmeas positivas. A infestação por ectoparasitos, presente em 81,03% dos cães avaliados, foi mais frequente (92,31%, n=36/39)

que animais sem infestação. Quanto ao tratamento carrapaticida, 64,31% (n=200/311) do total de cães recebem tratamento, tendo maior soropositividade os animais que não recebem tratamento (17,12%, n=19/111) apesar de não haver diferença estatística (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de cães positivos para *Babesia canis* diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função de características inerentes ao animal.

Variáveis	Diagnóstico por Elisa			Total
	Positivo	%	Negativo	
Área				
Rural	36	21,56 ^a	131	167
Urbana	3	2,08 ^b	141	144
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311
Sexo				
Macho	25	15,72 ^a	134	159
Fêmea	14	9,21 ^a	138	152
Total (p = 0,1182)	39	12,54	272	311
Definição racial				
Sem raça definida	34	15,18 ^a	190	224
Raça definida	5	5,75 ^b	82	87
Total (p = 0,0391)	39	12,54	272	311
Idade				
< 6 meses	0	0,00 ^b	19	19
≥ 6 meses até < 2 anos	14	20,59 ^a	54	68
≥ 2 até <5 anos	10	9,52 ^{ab}	95	105
≥ 5 até 10 anos	15	12,61 ^{ab}	104	119
Total (p = 0,0490)	39	12,54	272	311
Tamanho do pêlo				
Curto	20	11,11 ^a	160	180
Médio	16	16,33 ^a	82	98
Longo	3	9,09 ^a	30	33
Total (p = 0,3727)	39	12,54	272	311
Porte do animal				
Pequeno	15	15,63 ^a	81	96
Médio	20	12,35 ^a	142	162
Grande	4	7,55 ^a	49	53
Total (p = 0,3600)	39	12,54	272	311
Infestação por ectoparasitos				
Sim	36	14,63 ^a	216	252
Não	3	4,62 ^b	56	59
Total (p = 0,0338)	39	12,54	272	311
Infestação por carrapatos				
Sim	30	17,96 ^a	148	178
Não	9	6,25 ^b	124	133
Total (p = 0,0033)	39	12,54	272	311
Ausência de tratamento carrapaticida no cão				
Faz tratamento	20	10,00 ^a	180	200
Não faz tratamento	19	17,12 ^a	92	111
Total (p = 0,0760)	39	12,54	272	311
Histórico de doenças causadas por agentes transmitidos por carrapatos				
Sim	1	4,55 ^a	21	22
Não	38	13,15 ^a	251	289
Total (p = 0,4005)	39	12,54	272	311

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.1.6 Fatores associados ao comportamento, hábito e manejo dos cães com diagnóstico positivo para *Babesia canis* pelo método sorológico de ELISA

No presente estudo as variáveis relacionadas com o comportamento, hábito e manejo do animal como: animal vive dentro da residência, manejo no ambiente do cão com produtos ectoparasiticidas, tempo que o cão está na propriedade, histórico de infestação por carrapatos na propriedade, e histórico de infestação por carrapatos na vizinhança não apresentaram associação significativa ($p>0,05$) com a soropositividade para *Babesia canis* (Tabela 5).

Dentre o total de animais, 67,85% ($n=211/311$) vivem externamente à residência, tendo maior acesso ao ambiente externo, com soropositividade de 13,74% ($n=29/39$); quanto à utilização de ectoparasiticidas, 53,38% dos cães vivem em ambiente que recebe os produtos; o tempo que o animal vive na propriedade sob os manejos próprios de cada uma, não apresentou influência na positividade, apesar de 17,80% ($n=21/118$) dos soropositivos estarem na propriedade entre dois e cinco anos; 88,75% ($n=276/311$) de todos os animais apresentaram histórico anterior de infestação por carrapatos, com frequência de 92,31% ($n=36/39$) de soropositivos e sobre a infestação nas áreas circunvizinhas à propriedade, 95,82% ($n=298/311$) dos cães vivem nestas áreas; em relação ao manejo de vermifugação 63,34% ($n=197/311$) dos cães são vermifugados (Tabela 5).

As variáveis relacionadas ao comportamento, hábito, manejo e histórico de infestação do cão que apresentaram associação ($p<0,05$) com a positividade na sorologia pelo método de ELISA são descritas a seguir: em relação à origem do animal, apenas 9,67% ($n=31/311$) dos cães eram errantes (de rua), com maior frequência de soropositividade (25,81%, $n=8/311$), enquanto que cães de origem da própria propriedade e de outros locais, exceto a rua, corresponderam a 26,69% ($n=83/311$) e 63,34% ($n=197/311$), do total de cães, respectivamente; quanto aos “locais de acesso do animal”, observou-se que 45,66% ($n=142/311$) dos cães tinham acesso às pastagens, e destes, 24,65% ($n=35/142$) apresentaram-se soropositivos, enquanto que os cães que tinham acesso a ambiente urbano/quintal e áreas de mata apresentaram um frequência de positividade de 3,65% ($n=5/137$) e 2,94% ($n=1/34$), respectivamente. Cães com abrigo corresponderam a 59,81% do total ($n=186/311$), encontrando-se maior frequência de soropositividade (26,40%, $n=33/125$) nos cães sem abrigo ($n=125/311$).

Em relação ao hábito dos animais, 76,21% dos cães vivem soltos ($n=237/311$), com frequência de soropositividade de 15,61% ($n=37/237$), e nos animais que vivem sempre presos, (15,11%, $n=47/311$) observou-se uma soropositividade de 4,26% ($n=2/47$); quanto ao tipo de ambiente que o cão passa maior parte do tempo, 60,45% ($n=188/311$) dos cães ficam em local com presença de terra e cimentado, tendo maior frequência de positividade (31,43%, $n=11/35$) nos que ficam em áreas com presença de gramados e/ou pastagens, seguido por ambiente com terra e cimentado (12,77%, $n=24/188$); as más condições de higiene do ambiente foram altamente significativas ($p<0,0001$), com maior frequência de soropositividade (32,50%, $n=13/40$) em ambientes com condição de limpeza ruim.

O contato com outras espécies animais ocorreu em 58,2% ($n=181/311$) do total de cães, tendo frequência de soropositividade de 17,68% ($n=32/181$), com maior valor (38,78%, $n=19/49$) para os cães em contato com animais de produção e companhia; 44,75% ($n=81/181$) dos cães têm contato com animais de produção de pequeno e grande porte.

No quesito assistência veterinária, foi relatado que 41,16% ($n=128/311$) dos cães recebem assistência, e 58,84% ($n=183/311$) não recebem assistência, com maior frequência de positividade dentre estes (19,13%, $n=35/183$); o manejo de vacinação foi realizado em 74,92% ($n=233/311$) dos cães, tendo maior frequência de soropositividade (21,79%, $n=17/78$) nos animais não vacinados, que constituem 25,08% ($n=78/311$) do total de cães (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de cães positivos para *Babesia canis* diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função das características inerentes ao comportamento, hábito e manejo do cão.

Variáveis	Diagnóstico por ELISA			Total
	Positivo	%	Negativo	
Animal vive dentro da residência				
Sim	3	7,50 ^a	37	40
Não	29	13,74 ^a	182	211
Às vezes	7	11,67 ^a	53	60
Total (p = 0,5360)	39	12,54	272	311
Locais de acesso do animal				
Pastagem	35	24,65 ^a	107	142
Ambiente urbano/quintal	5	3,65 ^b	132	137
Mata	1	2,94 ^b	33	34
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311
Contato com outras espécies				
Sim	32	17,68 ^a	149	181
Não	7	5,38 ^b	123	130
Total (p = 0,0022)	39	12,54	272	311
Espécies em contato				
Animais de produção e companhia	19	38,78 ^a	30	49
Animais de produção	12	14,81 ^b	69	81
Animais de companhia	1	3,23 ^b	30	31
Silvestre, produção e companhia	0	0,00 ^b	20	20
Total (p < 0,0001)	32	17,68	149	181
Hábito do animal				
Solto	37	15,61 ^a	200	237
Sempre preso	2	4,26 ^b	45	47
Preso de dia e solto à noite	0	0,00 ^b	27	27
Total (p < 0,0120)	39	12,54	272	311
Ambiente que o cão passa maior parte do tempo				
De terra e/ou cimento	24	12,77 ^c	164	188
Cimentado e/ou ladrilhado	4	4,55 ^b	84	88
Grama e/ou pasto	11	31,43 ^a	24	35
Total (p < 0,0003)	39	12,54	272	311
Condição de limpeza do ambiente do animal				
Ruim	13	32,50 ^a	27	40
Moderada	18	13,33 ^b	117	135
Satisfatória	8	5,88 ^c	128	136
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311
Ausência do manejo ectoparasiticida no ambiente				
Presença do manejo	18	10,84 ^a	148	166
Ausência do manejo	21	14,48 ^a	124	145
Total (p = 0,4265)	39	12,54	272	311
Tem assistência veterinária				
Sim	4	3,13 ^b	124	128
Não	35	19,13 ^a	148	183
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311
Ausência de vacinação				
Não	22	9,44 ^b	211	233
Sim	17	21,79 ^a	61	78
Total (p = 0,0080)	39	12,54	272	311

Tabela 5. Continuação

Animal apresenta abrigo				
Sim	6	3,23 ^b	180	186
Não	33	26,40 ^a	92	125
Total (p < 0,0001)	39	12,54	272	311
Origem do animal				
Errante (de rua)	8	25,81 ^a	23	31
Nascido na propriedade	8	9,64 ^b	75	83
De fora (veio de outro lugar)	23	11,68 ^b	174	197
Total (p = 0,0329)	39	12,54	272	311
Tempo que o cão está na propriedade				
< 6 meses	3	10,00 ^a	27	30
≥6 meses a < 2 anos	6	10,53 ^a	51	57
≥2 a <5 anos	21	17,80 ^a	97	118
≥ 5 anos a <10	9	10,71 ^a	75	84
≥ 10 anos	0	0,00 ^a	22	22
Total (p = 0,1486)	39	12,54	272	311
Histórico de infestação por carrapatos				
Sim	36	13,04 ^a	240	276
Não	3	8,57 ^a	32	35
Total (p = 0,6300)	39	12,54	272	311
Histórico de infestação por carrapatos na vizinhança				
Sim	38	12,75 ^a	260	298
Não	1	7,69 ^a	12	13
Total (p = 0,7124)	39	12,54	272	311
Vermifugação				
Sim	21	10,66 ^a	176	197
Não	18	15,79 ^a	96	114
Total (p = 0,2549)	39	12,54	272	311

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.1.7 Fatores associados aos aspectos clínicos dos cães com diagnóstico positivo para *Babesia canis* pelo método sorológico de ELISA

No presente estudo foram verificadas as variáveis relacionadas com alguns aspectos clínicos e anamnese como: comportamento e estado de atenção do animal, hidratação, coloração de mucosas oral e ocular, histórico de distúrbios de coagulação, distúrbios atuais de coagulação, perfusão capilar, escore corporal, temperatura retal, ausculta cardíaca e pulmonar, inspeção visual, palpação e verificação de funções fisiológicas. Destas variáveis, algumas não foram consideradas para fins de avaliação estatística, mas sim, apenas para avaliação clínica do animal e retorno clínico-terapêutico para paciente e assim, sanar as dúvidas e ansiedades do proprietário. As variáveis avaliadas podem ser verificadas na tabela 6. Destas, apenas duas apresentaram associação significativa (p<0,05) com a soropositividade para *Babesia canis*: escore corporal e comportamento do cão. O escore corporal observado foi normal em 82,96% (n=258/311) dos cães, com maior soropositividade (28,57%, n=12/42) nos animais magros em relação aos normais (10,47%, n=27/258); a frequência de soropositividade da variável comportamento (estado de atenção do animal) apresentou-se maior nos animais tristes (30,0%, n=6/20), que corresponderam a 6,43% dos cães (n=20/311); nos animais em estado alerta e ativos, que corresponderam a 93,89% (n=292/311) dos cães, a frequência foi de 11,30% (n=33/292) (Tabela 6).

Com relação à hidratação, animais com turgor diminuído (desidratado) apresentaram 20% (n=3/15) de frequência soropositividade, ao passo que cães normohidratados, 12,16% (n=36/296); Quanto à coloração de mucosas, 75,88% (n=236/311) e 80,06% (249/311) dos cães apresentaram mucosas ocular e oral normocoradas, respectivamente, com frequência de positividade em torno de 17% para ambas as formas hipocoradas; Distúrbios de coagulação no momento do exame clínico foram observados em apenas 3,86% (n=12/311) dos cães avaliados, com frequência de 8,33% (n=1/12), sendo o histórico de distúrbio de coagulação relatado em apenas 2,25% (n=7/311) da população de cães estudada; a perfusão capilar não apresentou associação com soropositividade, porém ocorreu maior frequência (21,74%, n=5/23) em cães com perfusão capilar diminuída (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de cães positivos para *Babesia canis* diagnosticados pelo método sorológico de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), em função dos aspectos clínicos do cão.

Aspectos clínicos	Diagnóstico por ELISA			Total
	Positivo	%	Negativo	
Turgor				
Diminuído	3	20,00 ^a	12	15
Normal	36	12,16 ^a	260	296
Total (p = 0,4133)	39	12,54	272	311
Mucosa Oral				
Hipocorada	11	17,74 ^a	51	62
Normocorada	28	11,24 ^a	221	249
Total (p = 0,2428)	39	12,54	272	311
Mucosa Ocular				
Hipocorada	13	17,33 ^a	62	75
Normocorada	26	11,02 ^a	210	236
Total (p = 0,2154)	39	12,54	272	311
Histórico de distúrbios de coagulação				
Sim	0	0,00 ^a	7	7
Não	39	12,83 ^a	265	304
Total (p = 0,6022)	39	12,54	272	311
Distúrbios atuais de coagulação				
Sim	1	8,33 ^a	11	12
Não	38	12,71 ^a	261	299
Total (p = 0,9966)	39	12,54	272	311
Perfusão capilar				
Normal	34	11,81 ^a	254	288
Diminuída	5	21,74 ^a	18	23
Total (p = 0,3171)	39	12,54	272	311
Escore corporal				
Magro	12	28,57 ^a	30	42
Normal	27	10,47 ^{ab}	231	258
Obeso	0	0,00 ^a	11	11
Total (p = 0,0020)	39	12,54	272	311
Comportamento do cão				
Apático	6	30,00 ^a	14	20
Normal	33	11,30 ^b	258	292
Total (p = 0,0269)	39	12,54	272	311

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.1.8 Características das propriedades visitadas

Foram visitadas 113 residências e/ou propriedades nas zonas rurais e urbanas localizadas no município de Seropédica, RJ, sendo 51,32% localizadas em áreas rurais e 48,67% em áreas urbanas. No presente estudo foi observado que 36,21% (n=21/58) e 5,45% (n=3/55) dos domicílios rurais e urbanos, respectivamente, tinham cães soropositivos para *Babesia canis*. Houve forte associação entre a soropositividade para *Babesia canis* com área de domicílio do cão (rural ou urbano), sendo 92,31% (n=36/39) dos cães soropositivos domiciliados em área rural. Em relação ao número de propriedades visitadas verificou-se que 21,24% (n=24/113) delas possuíam pelo menos um cão soropositivo. Quanto ao tipo de residência, 99,11% (n=112/113) era construção de alvenaria, e apenas uma residência (0,88%) de pau-a-pique.

Quanto ao número de cães nas propriedades, 61,06% (n=69/113) destas possuíam dois a quatro cães, 25,66% (n=29/113) somente um animal e 13,27% (n=15/113) possuíam cinco ou mais animais. O tipo de vegetação mais frequente no entorno da propriedade foi a presença de jardim (40,71%, n=46/113), que às vezes continha algumas árvores frutíferas de pequeno a médio porte, seguido de ambientes sem vegetação (26,55%, n=30/113), ambientes com mata ao redor da propriedade (23,01%, n=26/113), propriedades com áreas de pastagem com resquícios de mata (7,96%, n=9/113) e propriedades somente arborizadas (1,77%, n=2/113).

Dentre as propriedades visitadas, 61,95% (n=70/113) possuíam presença de animais silvestres no entorno e 38,05% (n=43/113) não possuíam, sendo 77,14% (n=54/70) destes representados por gambás, pequenos roedores e répteis, 11,43% (n=8/70) por gambás e pequenos primatas, 10% (n=7/70) por capivaras, gambás e répteis, e 1,43% (n=1/70) por aves silvestres. O tipo de área com animais silvestres no entorno foi caracterizada como rural em 58,57% (n=41/70) das propriedades e 41,43% (n=29/70) como área urbana (Tabela 7).

Tabela 7. Características das propriedades localizadas no município de Seropédica, RJ, relacionadas ao estudo sorológico de cães para *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ.

Características relacionadas à Propriedade e manejo	Valores Absolutos	Percentual (%)
Tipo de residência	(n= 113)	
Alvenaria	112	99,11
“Pau-a-pique”	1	0,88
Tipo de zona	(n= 113)	
Rural	58	51,32
Urbana	55	48,67
Parasitismo por carrapatos em pessoas na propriedade	(n= 113)	
Sim	57	50,44
Não	56	49,55
Número de cães na propriedade	(n= 113)	
Um	29	25,66
Dois a quatro	69	61,06
Igual ou acima de cinco	15	13,27
Tipo de vegetação no entorno da propriedade	(n=113)	
Sem vegetação	30	26,55
Jardim	46	40,71
Mata	26	23,01
Pastagem com mata	9	7,96
Arborizada	2	1,77

Tabela 7. Continuação

Presença de animais silvestres no entorno da propriedade		
		(n= 113)
Sim	70	61,95
Não	43	38,05
Tipo de área com Presença de animais silvestres no entorno		
		(n= 70)
Rural	41	58,57
Urbana	29	41,43
Tipos de animais		
		(n= 70)
Aves silvestres	1	1,43
Capivara, gambá e répteis	7	10,00
Gambá, pequenos roedores e répteis	54	77,14
Gambá e pequenos primatas	8	11,43

4.1.9 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção e perfil dos proprietários

Em relação à informação que o proprietário possui sobre os riscos dos carrapatos, 74,33% (n=84/113) estavam cientes sobre os riscos, e 25,66% (n=29/113) não tinham conhecimento sobre os riscos, e quanto à informação sobre doenças transmitidas por carrapatos, 70,23% (n=59/84) desconheciam o assunto, e 29,76% (n=25/84) detinham o conhecimento.

O parasitismo por carrapatos em pessoas ocorreu em 50,44% (n=57/113) dos entrevistados, e 49,55% (n=56/113) relataram não terem sido parasitados por carrapatos. O nível sócio econômico, que foi um parâmetro medido por observação, 53,09% (n=60/113) encontraram-se na classe média, 39,82% (n=45/113) na classe baixa e 7,07% (n=8/113) na classe alta.

O grau de escolaridade dos proprietários ficou enquadrado como: 35,39% (n=40/113) não declarou sobre o assunto, 18,58% (n=21/113) tinham o 1º grau incompleto, 6,19% (n=7/113) tinham o 1º grau completo, 1,76% (n=2/113) tinham o ensino médio incompleto, 8,84% (n=10/113) tinham o ensino médio completo, 1,76% (n=2/113) tinham o nível superior incompleto e 22,12% (n=25/113) tinham o nível superior completo.

O uso de ectoparasiticidas no ambiente de criação dos animais ocorria em 29,20% (n=33/113) das propriedades e 70,80% (n=80/113) delas, não realizavam este manejo.

A classe química dos produtos utilizados era a seguinte: 36,36% (n=12/33) das propriedades utilizavam compostos piretróides, 33,33% (n=11/33) utilizavam piretróides, amidinas e organofosforados, 18,18% (n=6/33) utilizavam piretróides e amidinas, 12,12% (n=4/33) utilizavam somente amidinas. O uso dos ectoparasiticidas não possuía critério estabelecido por parte dos proprietários (Tabela 8).

Tabela 8. Percepção dos proprietários, orientação clínica, condição econômica, formas de limpeza utilizadas no local onde permanece o animal e medidas de controle adotadas para infestação por carrapatos, relacionadas ao estudo de *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ.

Percepção do proprietário	Valores Absolutos	Percentual (%)
Proprietário informado sobre os riscos de carrapatos?	(n=113)	
Sim	84	74,33
Não	29	25,66
Proprietários informados sobre doenças transmitidas por carrapatos?	(n=84)	
Sim	25	29,76
Não	59	70,23
Parasitismo por carrapatos em pessoas na propriedade	(n= 113)	
Sim	57	50,44
Não	56	49,55
Nível sócio econômico (observacional)	(n=113)	
Baixa	45	39,82
Média	60	53,09
Alta	8	7,07
Grau de escolaridade do proprietário	(n=113)	
Não informou	40	35,39
1º grau incompleto	21	18,58
1º grau completo	7	6,19
Ensino médio incompleto	2	1,76
Ensino médio completo	10	8,84
Superior incompleto	2	1,76
Superior completo	25	22,12
Uso de ectoparasiticidas no ambiente	(n=113)	
Sim	33	29,20
Não	80	70,80
Classes químicas dos produtos	(n=33)	
Piretróides	12	36,36
Piretróides, amidinas e fosforados	11	33,33
Piretróides e amidinas	6	18,18
Amidinas	4	12,12

4.1.10 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais

Segundo informações dos proprietários em relação à assistência veterinária dos cães, 41,15% (n=128/311) dos cães estudados (n=311), apresentavam assistência, e 58,84% (n=183/311) não apresentavam, sendo a frequência de assistência veterinária semestralmente em 44,53% (n=57/128) dos cães, 39,06% (n=50/128) somente quando o animal apresentava-se doente, 14,84% (n=19/128) não informou sobre o assunto e 1,56% (n=2/128) dos cães eram assistidos pelo menos uma vez no ano. A alimentação dos cães era feita por ração comercial em 33,12% (n=103/311) dos cães, por comida caseira em 11,90% (n=37/311) e por ambas (ração e comida caseira) em 54,98% (n=171/311) dos cães.

Quanto ao manejo de vermifugação, 63,34% (n=197/311) dos cães eram vermifugados e 36,66% (n=114/311) não recebiam o manejo, sendo a orientação para vermifugação feita

por veterinário em 36,55% (n=72/197) dos cães, por balconista em 17,26% (n=34/197) dos cães, por indicação de leigos em 12,18% (n=24/197) dos cães, por propaganda em 6,6% (n=13/197) dos cães, e não prestaram esclarecimento sobre o critério de escolha para vermifugação, os proprietários de 27,41% (n=54/197) dos cães.

O tratamento carrapaticida era realizado em 64,31% (n=200/311) dos cães e 35,69% (n=111/311) dos cães não recebiam este tratamento, sendo o critério para estabelecimento do tratamento feito por veterinário em 31% (n=62/200) dos cães, por balconista em 10% (n=20/200) dos cães, por indicação de leigos em 20% (n=40/200) dos cães, por propaganda em 3,5% (n=7/200) dos cães, e não prestaram esclarecimento sobre o critério de escolha para vermifugação, os proprietários de 35,5% (n=71/200) dos cães (Tabela 9). As variáveis foram estudadas em relação aos cães (n=311) individualmente, por haver numa mesma propriedade diferença de manejo entre os cães.

Tabela 9. Percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais, relacionados ao estudo de *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ.

Percepção do proprietário	Valores Absolutos	Percentual (%)
Assistência veterinária (n= 311)		
Sim	128	41,15
Não	183	58,84
Frequência da assistência veterinária (n= 128)		
Só quando fica doente	50	39,06
A cada seis meses	57	44,53
Pelo menos uma vez ao ano	2	1,56
Não informou	19	14,84
Vermifugação (n= 311)		
Sim	197	63,34
Não	114	36,66
Orientação para vermifugação (n=197)		
Balconista	34	17,26
Indicação	24	12,18
Propaganda	13	6,60
Veterinário	72	36,55
Sem resposta	54	27,41
Realiza tratamento carrapaticida (n= 311)		
Sim	200	64,31
Não	111	35,69
Orientação para tratamento carrapaticida (n=200)		
Balconista	20	10,00
Indicação	40	20,00
Propaganda	7	3,50
Veterinário	62	31,00
Sem resposta	71	35,50
Tipo de alimentação dos cães (n= 311)		
Ração	103	33,12
Comida caseira	37	11,90
Ambos	171	54,98

4.2 Diagnóstico de *Babesia canis* pela Técnica de PCR em Tempo real a partir de Amostras Sanguíneas de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ

Das 311 amostras sanguíneas testadas pela PCR em tempo real, 37 (11,90%) apresentaram amplificação do fragmento de 71pb do gene *18S rRNA*, específico para *Babesia* sp., sendo 23 (62,16%) de cães de área rural e 14 (37,84%) de área urbana. O valor médio de C_T observado nas amostras positivas foi de $28,17 \pm 4,47$ ciclos variando entre 20 e 35 ciclos. A temperatura de dissociação (T_m) dos produtos amplificados apresentou valor médio de $75,08 \pm 0,64^\circ\text{C}$, semelhante a do controle positivo (Figura 6). As amostras positivas na PCR em tempo real e submetidas à eletroforese em gel de agarose apresentaram bandas com o tamanho esperado de 71 pb. Entre as amostras com C_T maior que 35 ciclos não foram observadas bandas, provavelmente em função da baixa concentração dos produtos amplificados.

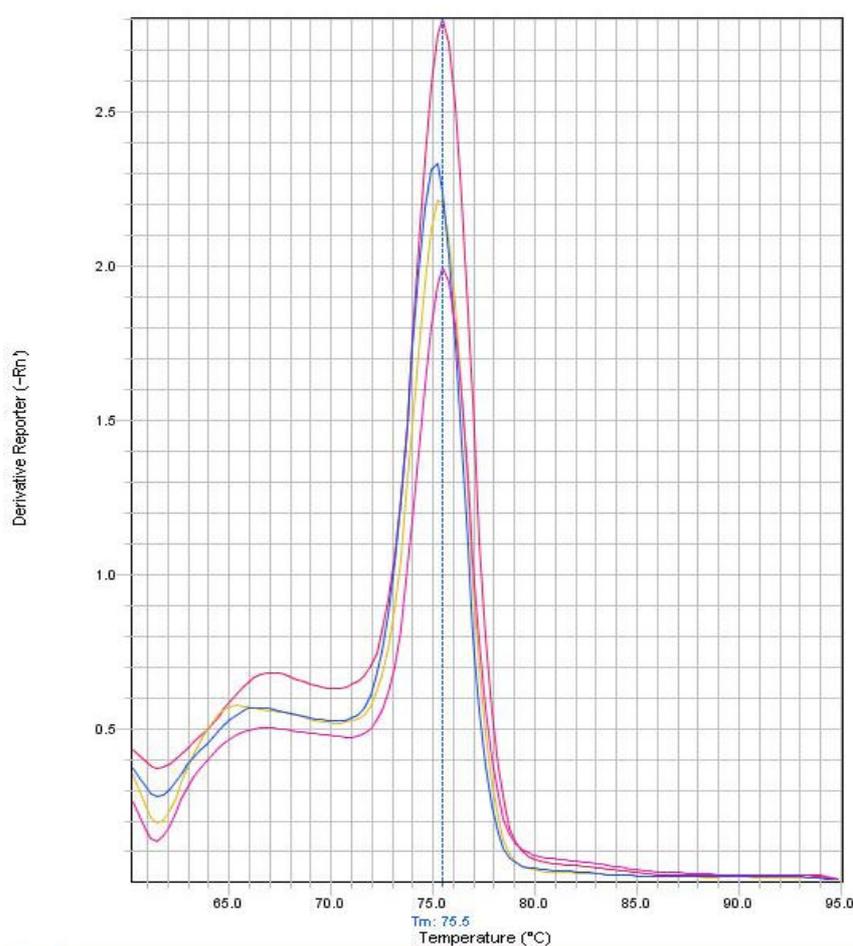


Figura 6. Curva de dissociação (*Melting Curve*) do fragmento de 71pb do gene *18S rRNA* do controle positivo e das amostras de cães positivas mostrando a especificidade de amplificação de *Babesia* spp. pela PCR em tempo real.

4.2.1 Sensibilidade da técnica de PCR em tempo real para diagnóstico de *Babesia* spp.

Usando um número conhecido de cópias do vetor-inserto, a sensibilidade analítica da técnica da PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR green foi avaliada. O limite de detecção da técnica foi de uma cópia do plasmídeo contendo o gene *18S rRNA* de *Babesia* spp.

O coeficiente de correlação de seis repetições das sete diluições testadas na curva padrão foi de 99,6%, com C_T variando de $15,15 \pm 0,17$ ciclos na primeira diluição (3×10^6 cópias do plasmídeo) até $32,68 \pm 0,08$ ciclos na última diluição (uma cópia do plasmídeo) (Figura 7).

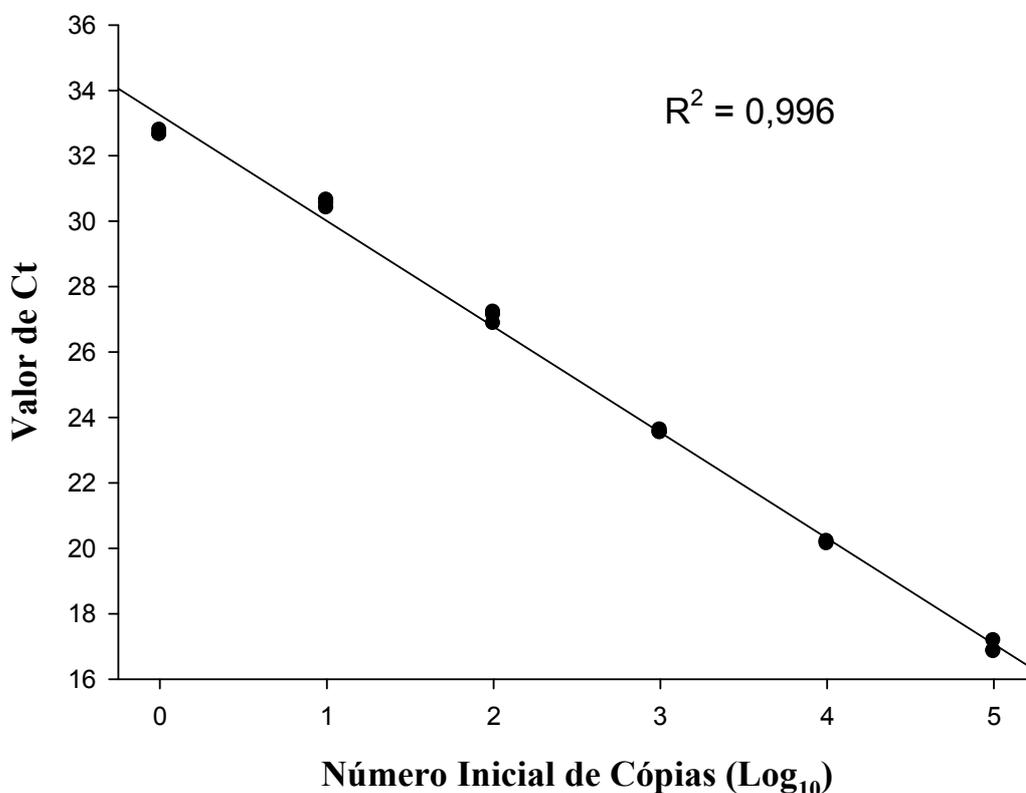


Figura 7. Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 71 pares de base do gene *18S rRNA* de *Babesia* spp. O valor de C_T obtido pela PCR em tempo real foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo utilizando o sistema SYBR green.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na sensibilidade analítica quando $1 \mu\text{L}$ de DNA do sangue total de um cão não infectado foi adicionado na PCR. As curvas apresentaram a mesma inclinação durante a fase exponencial da amplificação demonstrando a eficiência da reação mesmo nos pontos com pouco alvo (Figura 8). Quando a especificidade da PCR em tempo real foi avaliada em relação a outros patógenos proximamente relacionados (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii* e *Rickettsia rickettsia*) somente o DNA de *Babesia* spp. produziu sinal fluorescente.

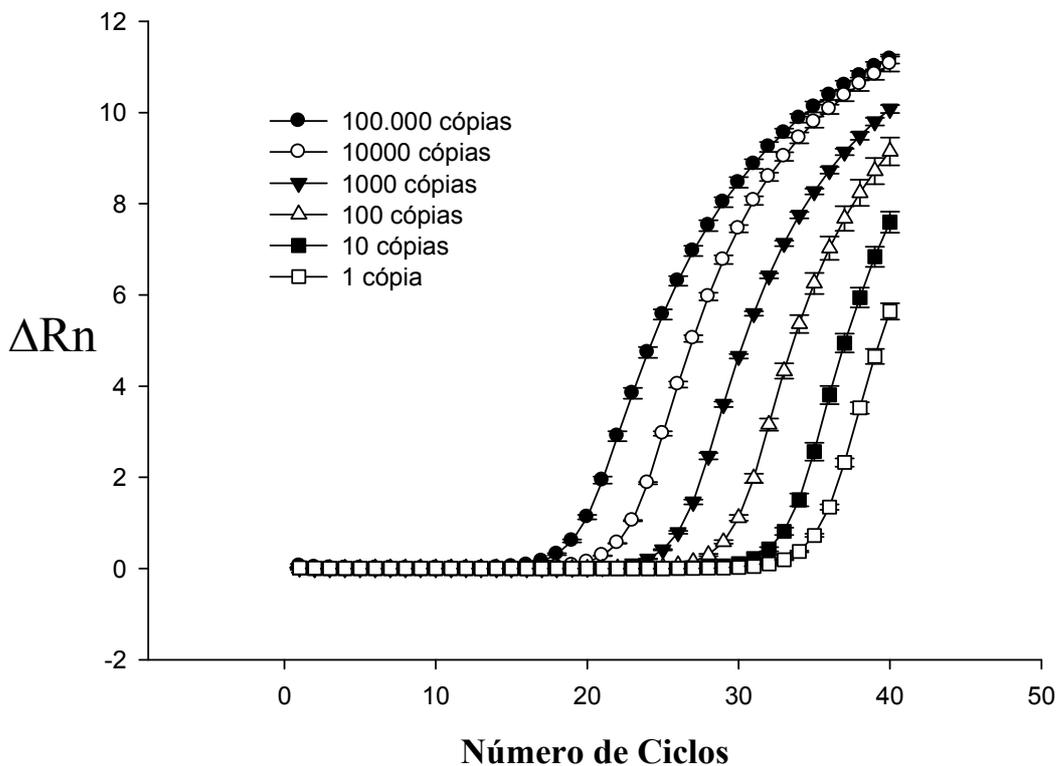


Figura 8. Sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green para a detecção de amplificação. A curva mostra amplificação de diluições seriadas (1 – 100.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 71 pares de base do gene *18S rRNA* de *Babesia* spp.

4.2.2 Diagnóstico de subespécies de *Babesia canis* pela técnica de RFLP a partir de DNA amplificado pela PCR em tempo real de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ

Das 311 amostras sanguíneas de cães testadas pela PCR em tempo real, 37 (11,90%) foram positivas. As amostras positivas apresentaram amplificação do fragmento de aproximadamente 71pb do gene 18s RNA, específico para *Babesia* spp., utilizando a combinação de primers *Babesia* Real-F e *Babesia* Real-R (LISBÔA, 2010). As amostras de DNA positivas foram submetidas à amplificação com os pares de iniciadores PIRO-A e PIRO-B (CARRET et al., 1999). O material amplificado foi visualizado após ser submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, visualizando fragmentos com cerca de 400pb (figura 9).

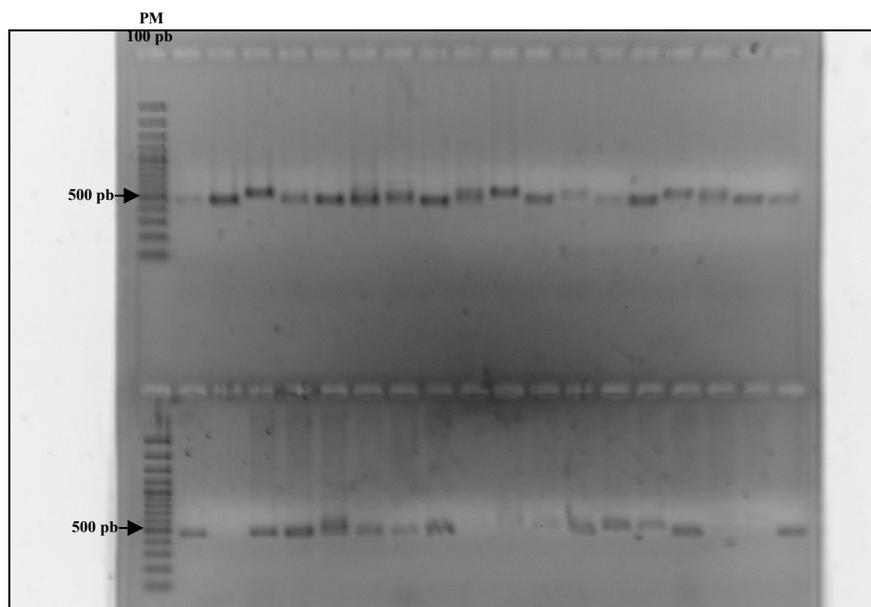


Figura 9. Visualização da amplificação com os pares de “primers” PIRO A e PIRO B após ser submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. Fragmentos com cerca de 480 pb.

Os produtos da PCR foram submetidos à Técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição) para determinação dos fragmentos de restrição, utilizando-se as enzimas de restrição *Hinf*I e *Taq*I para distinção das subespécies de *B. canis* (*Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*).

Os produtos digeridos foram visualizados em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. Os resultados encontrados para a digestão com *Hinf*I (por 3 horas a 37°C) e por *Taq*I (por 3 horas a 65°C) podem ser verificados a seguir:

A digestão com *Taq*I apresentou separação em dois fragmentos com aproximadamente 200pb e 280pb, resultando neste caso, em *Babesia canis vogeli* (Figura 10). Nesta digestão foram visualizados também fragmentos com tamanho em torno de 500 pb, que podem ser considerados como de *Hepatozoon canis*, que corroboram os achados de O’Dwyer et al. (2009) e Lisbôa (2010), os quais utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos obtiveram os mesmos resultados, confirmando os achados mediante sequenciamento das amostras obtidas.

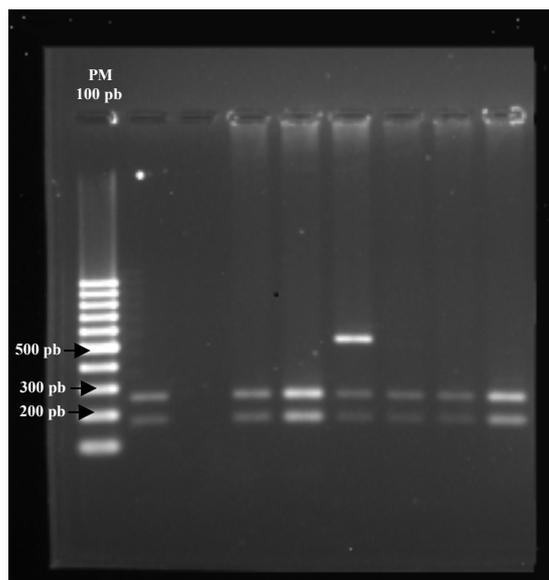


Figura 10. Visualização da digestão enzimática com *TaqI*. A digestão com *TaqI* apresentou separação em dois fragmentos com aproximadamente 200pb e 280pb, compatíveis com a subespécie *Babesia canis vogeli*. Nesta digestão foi visualizado também fragmento com tamanho em torno de 500 pb, compatível com *Hepatozoon* sp.

A digestão com *Hinf* I não apresentou separação em bandas para as amostras avaliadas. Neste processo também foram observados fragmentos com aproximadamente 500pb, como mencionado anteriormente (Figura 11). Em ambos os processos de restrição foram verificados no gel sítios de restrição não compatíveis com os sítios das enzimas utilizadas, em seis amostras, sugerindo a presença de algum outro patógeno, que ainda não foi determinado neste estudo. As amostras serão futuramente sequenciadas.

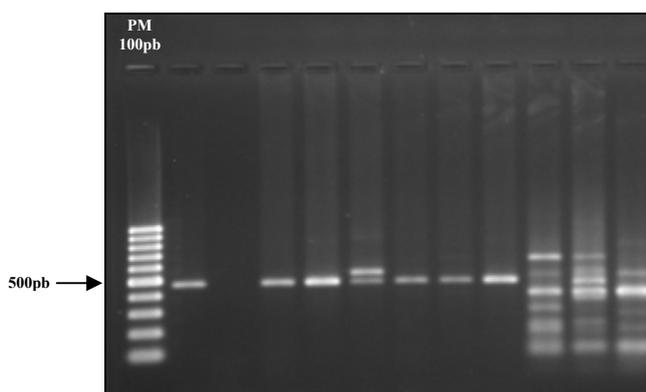


Figura 11. Visualização da digestão enzimática com *Hinf* I. Neste processo também foram observados fragmentos com aproximadamente 500pb. Nas últimas três amostras, foi verificado um padrão de digestão não compatível para esta enzima.

4.2.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos cães com diagnóstico positivo para *Babesia canis* pela técnica de PCR em tempo real

Para a avaliação dos resultados hematológicos, os grupos de cães foram divididos em função das variáveis hematológicas para verificar a frequência das diferentes alterações hematológicas dentro de cada grupo, com avaliação de parâmetros em perfis aumentada,

normal e diminuída dentro de cada grupo positivo e negativo através da técnica de PCR em tempo real.

A avaliação dos valores médios dos parâmetros hematológicos entre os animais positivos e negativos para não diferiram significativamente ($p>0,05$) nos seguintes parâmetros: hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume plaquetário médio (VPM), amplitude de distribuição das hemácias (ADH) e sólidos totais. Estes parâmetros apresentaram valores médios dos animais positivos dentro da faixa de valor de referência para a espécie (Tabela 10).

Tabela 10. Eritrograma e sólidos totais de cães positivos na PCR em tempo real para *Babesia canis* em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais**
						Mínimo	Máximo	
He ($\times 10^6/\text{mm}^3$)*	Positivo	37	4.97 ^a	1.12	0.18	3.10	7.90	5,50 -8,50
	Negativo	274	5.69 ^b	1.50	0.09	1.00	10.00	
HB (g/dL)*	Positivo	37	11.43 ^a	2.74	0.45	7.50	18.10	12,00 - 18,00
	Negativo	274	12.92 ^b	3.43	0.21	2.90	25.00	
HT (%)*	Positivo	37	31.20 ^a	8.09	1.33	17.80	54.80	37,00 - 55,00
	Negativo	274	36.23 ^b	10.41	0.63	7.80	70.00	
VCM (fm^3)	Positivo	37	62.59 ^a	4.85	0.80	50.00	71.00	60 – 77
	Negativo	274	63.37 ^a	5.33	0.32	43.00	80.00	
HCM (pg)	Positivo	37	23.02 ^a	1.49	0.25	20.10	26.80	22,00 - 27,00
	Negativo	274	22.75 ^a	2.85	0.17	7.00	29.90	
CHCM (g/dL)	Positivo	37	36.95 ^a	3.32	0.55	31.50	46.20	32,00 - 36,00
	Negativo	274	35.95 ^a	4.12	0.25	11.80	43.00	
ADH (%)	Positivo	37	16.01 ^a	1.62	0.27	13.20	19.60	14,00 – 17,00
	Negativo	274	15.84 ^a	1.88	0.11	4.90	22.00	
PLAQ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	142.03 ^a	95.54	15.71	22.00	438.00	200 – 500
	Negativo	274	204.82 ^b	132.74	8.02	15.00	900.00	
MPV (fm^3)	Positivo	37	10.00 ^a	1.79	0.29	7.80	17.40	6,70 - 11,10
	Negativo	274	9.77 ^a	1.64	0.10	3.10	16.70	
Sólidos Totais (g/dL)	Positivo	37	7.64 ^a	1.24	0.20	5.40	10.40	6,00 - 8,00
	Negativo	274	7.92 ^a	1.24	0.07	4.40	12.00	

*Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste F a 5% de significância ($p<0,05$). ^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância ($p<0,05$). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH: amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Weiss e Wardrop (2010).

Os parâmetros hematológicos que diferiram significativamente ($p<0,05$) e apresentaram valores médios abaixo do limite de referência nos animais positivos foram: o número de eritrócitos (HE), que foi de $4,97 \times 10^6/\text{mm}^3$, o hematócrito (HT) 31,20%, concentração de hemoglobina (HB) 11,43 g/dL e número de plaquetas $142.030/\text{mm}^3$. Estes parâmetros encontraram-se dentro dos limites de referência nos cães negativos, exceto no hematócrito, que se apresentou inferior, com média de 36,23% (Tabela

10). Em relação ao número de hemácias, 67,6% (n=25/37) dos cães positivos e 44,20% (n=121/274) dos cães negativos apresentaram valores abaixo dos de referência para a espécie;

Quanto ao hematócrito, 83,8% (n=31/37) dos cães positivos e 54% (n=148/274) dos cães negativos apresentaram o mesmo padrão anteriormente citado; a concentração de hemoglobina encontrou-se diminuída em 67,6% (n=25/37) dos cães positivos e 38,7% (n=106/274) dos cães negativos e em relação ao número de plaquetas, 81,1% (n=30/37) dos cães positivos e 59,1% (n=162/274) dos cães negativos apresentaram o mesmo comportamento hematológico de diminuição. Estes parâmetros apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). (Figura 12)

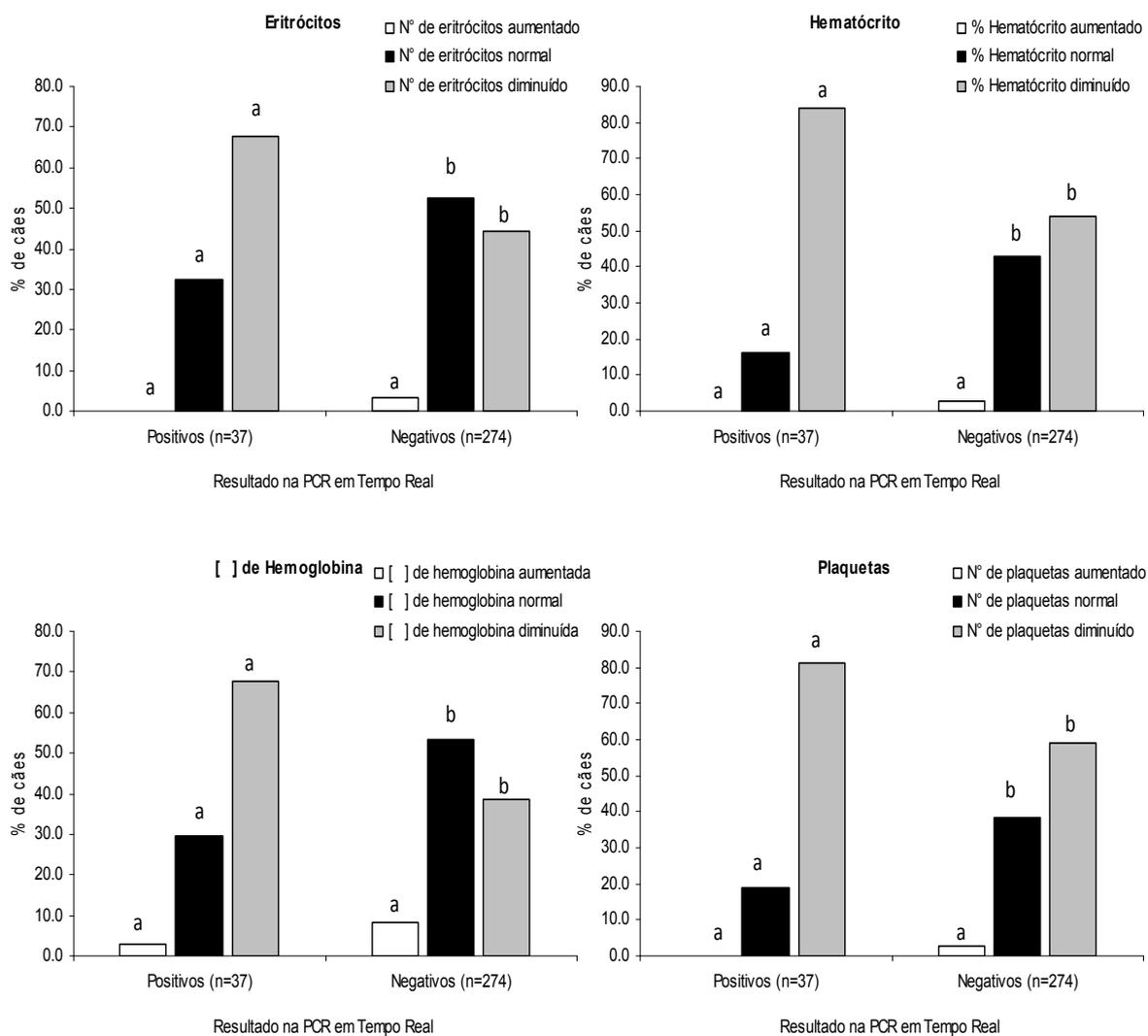


Figura 12. Frequência de cães com alterações no número de eritrócitos, no valor do hematócrito, na concentração de hemoglobina plasmática e número de plaquetas em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. ^aLetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

A frequência de alterações nos índices hematimétricos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição das hemácias não diferiram entre os grupos de animais positivos e negativos. (Figura 13)

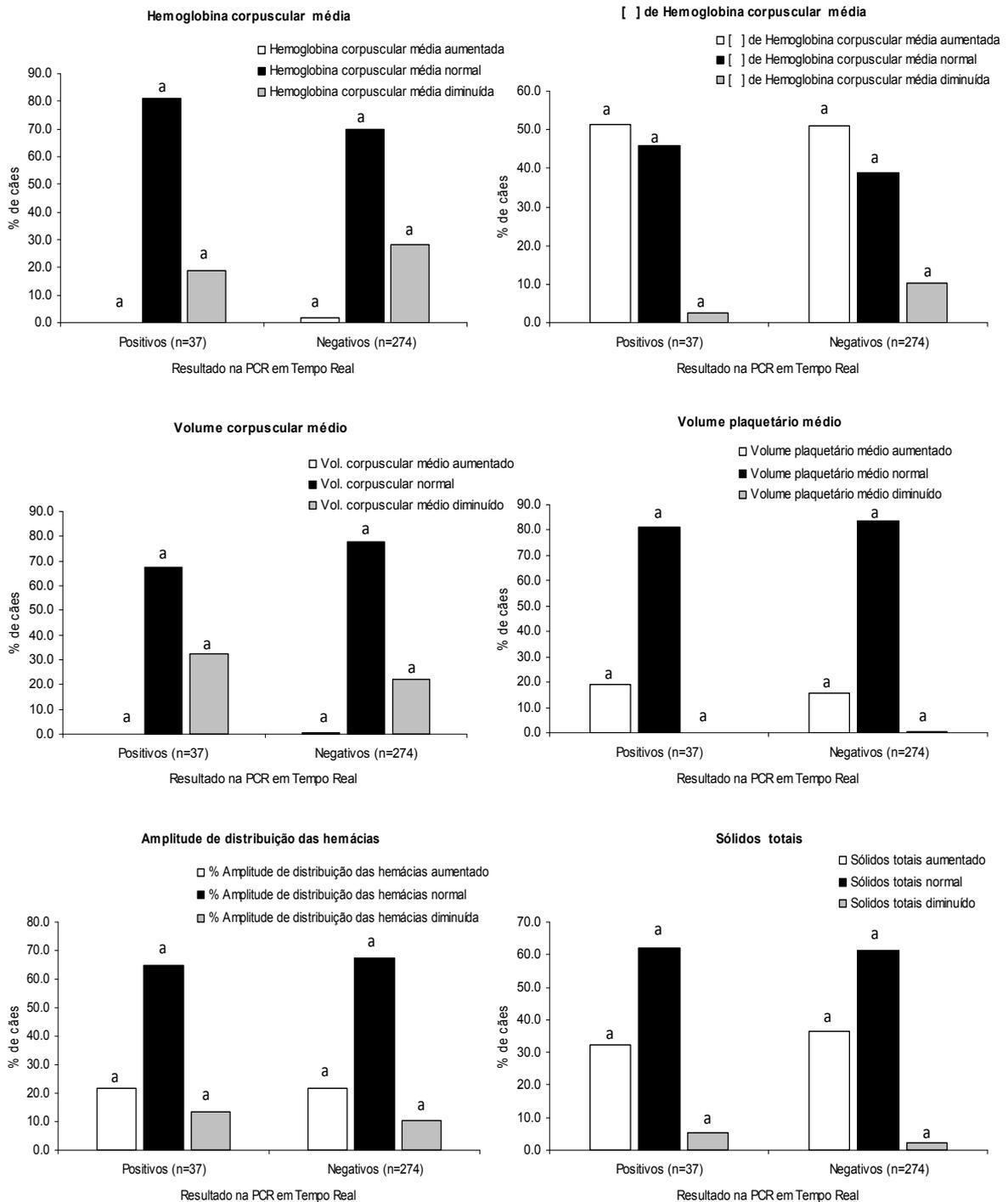


Figura 13. Frequência de cães com alterações nos índices hematimétricos (hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio, volume plaquetário médio, amplitude de distribuição das hemácias) e sólidos totais plasmáticos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. ^aLetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

A avaliação dos parâmetros médios da série branca apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre positivos e negativos, no número de leucócitos (LEUC), que se apresentaram dentro dos limites de referência, porém com menor valor (11,73%) nos positivos que nos cães negativos (13,71%); e no número de monócitos (MON) foram verificadas médias dentro da faixa de referência, porém com menor contagem nos positivos (0,48%) em relação aos negativos (0,86%).

Os parâmetros médios da série branca que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre os animais positivos e negativos para *B. canis vogeli* foram: número de linfócitos (LINF), número de bastões (BAST), número de segmentados (SEGM), número de eosinófilos (EOS) e número de basófilos (BASO) (Tabela 11).

Tabela 11. Leucograma de cães positivos na PCR em tempo real para *Babesia canis*. Cães domiciliados em áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores* Referenciais
						Mínimo	Máximo	
LEUC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	11.73 ^a	5.14	0.85	4.50	27.50	6,00 - 17,00
	Negativo	274	13.71 ^b	6.30	0.38	0.40	50.10	
LINF ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	2.73 ^a	2.00	0.33	0.50	10.18	1,00 – 4,80
	Negativo	274	3.01 ^a	2.32	0.14	0.11	16.52	
BAST ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	0.22 ^a	0.29	0.05	0.00	1.26	0,00 – 0,30
	Negativo	274	0.29 ^a	0.52	0.03	0.00	3.66	
SEGM ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	7.42 ^a	3.59	0.59	1.94	16.72	3,00 – 11,50
	Negativo	274	8.58 ^a	4.59	0.28	0.18	39.58	
MON ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	0.48 ^a	0.41	0.07	0.00	1.89	0,15 – 1,35
	Negativo	274	0.86 ^b	0.70	0.04	0.00	4.01	
EOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	0.86 ^a	1.05	0.17	0.00	3.61	0,10- 1,25
	Negativo	274	0.96 ^a	1.17	0.07	0.00	8.65	
BASO ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Positivo	37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Raro
	Negativo	274	0.00	0.03	0.00	0.00	0.33	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância ($p < 0,05$). LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; BAST: Neutrófilo em bastão; SEGM: Neutrófilo segmentado; MON: monócitos; EOS: Eosinófilos; BASO: Basófilo; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Weiss e Wardrop (2010).

Todos os valores médios do leucograma apresentaram-se dentro do intervalo de referência para a espécie, tanto para os cães positivos quanto para os negativos, porém com valores menores nos cães positivos.

Com relação à leucometria, o parâmetro que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) foi a contagem de monócitos. Monocitopenia foi verificada em 16,2% ($n=6/37$) e 9,5% ($n=26/274$) dos cães positivos e negativos, respectivamente, enquanto que a monocitose foi observada em 2,7% ($n=1/37$) dos positivos e 18,6% ($n=51/274$) entre os cães negativos.

As frequências relacionadas aos animais positivos e negativos que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) foram: contagem de leucócitos, que apresentou uma tendência à leucopenia nos positivos (8,1%) em relação aos negativos (6,9%); número de bastões, com maior tendência de aumento nos positivos (29,7%) em detrimento aos negativos (27%); número de segmentados, com maior neutrofilia entre os positivos (18,9%) do que nos negativos (17,5%) e neutropenia nos positivos (8,1%) que nos negativos (5,5%); número de eosinófilos, número de basófilos e linfócitos (Figura 14).

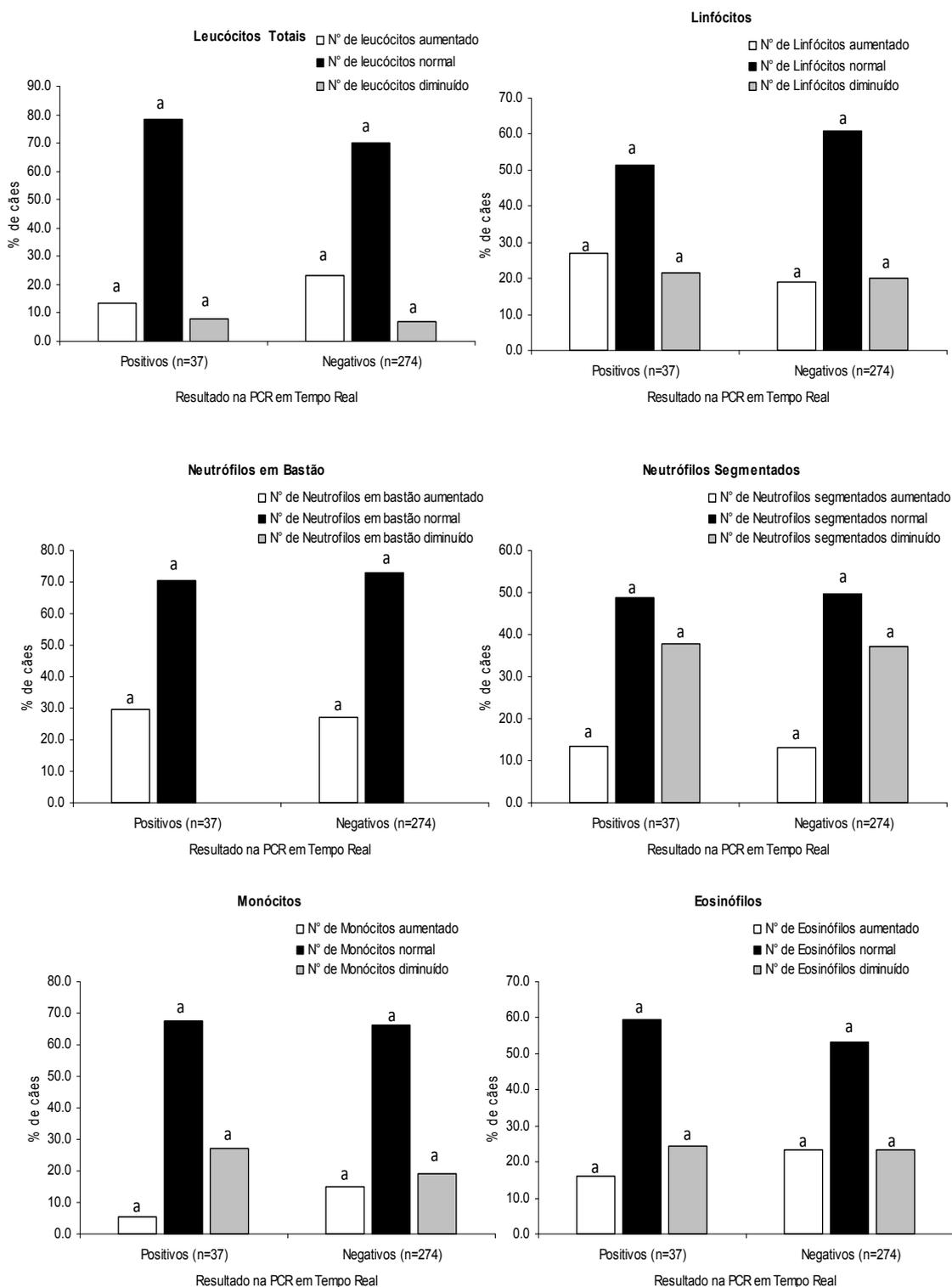


Figura 14. Frequência de cães com alterações na leucometria global, número absoluto de linfócitos, neutrófilos em bastão, neutrófilos segmentados, monócitos e eosinófilos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Babesia canis*. ^aLetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.2.4 Avaliação do ectoparasitismo em cães e associação com diagnóstico positivo para *Babesia canis* em amostras sanguíneas de cães através da PCR em tempo real

A Infestação por ectoparasitos foi observada em 91,89% (n=34/37) dos cães positivos na PCR em tempo real para *B. canis*. Em 83,78% (n=31/37) dos cães positivos verificou-se a presença de carrapatos nos cães no momento da coleta, que teve associação (p=0,0010) com a infecção por *B. canis*, apresentando uma frequência de positividade de 17,42% (n=31/178). Os animais sem carrapatos (16,22% dos positivos) no momento da coleta apresentaram a frequência de positividade de 4,51% (n=6/133) (Figura 15).

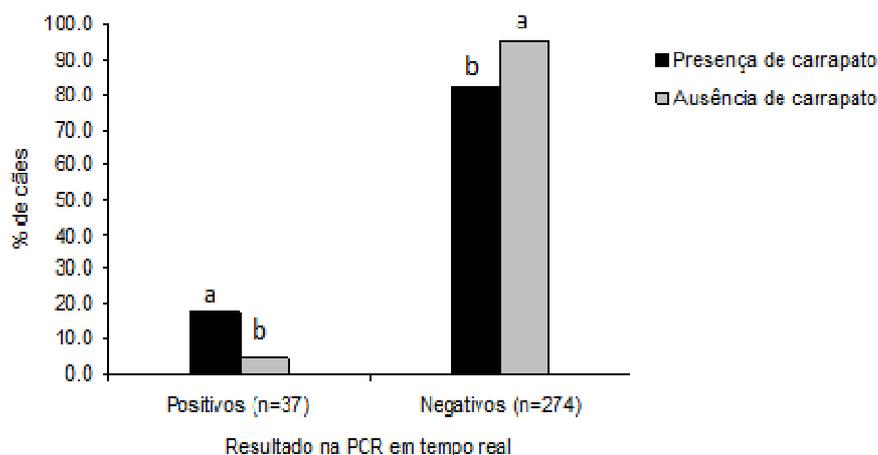


Figura 15. Frequência de carrapatos em cães positivos para *Babesia canis* no município de Seropédica, RJ.

A espécie de carrapato mais frequente nos cães positivos foi *R. sanguineus* (59,46%, n=22/37), sendo a única que apresentou associação (p=0,0122) com a positividade para *B. canis*, seguidos por ninfas de *A. cajennense* (18,92%, n=7/37), ninfas de *R. sanguineus* (10,81%, n=4/37), *A. cajennense* (5,41%, n=2/37) e larvas de Ixodidade (2,7%, n= 1/37). Co-infestações por *A. cajennense* e *R. sanguineus* foram observadas em 8,11% (n=3/37) dos cães positivos. Avaliando a positividade para *B. canis* em função da espécie de carrapato encontrada sobre os cães, observou-se que 18,03% (n=22/122) estavam infestados com *R. sanguineus* (Figura 16).

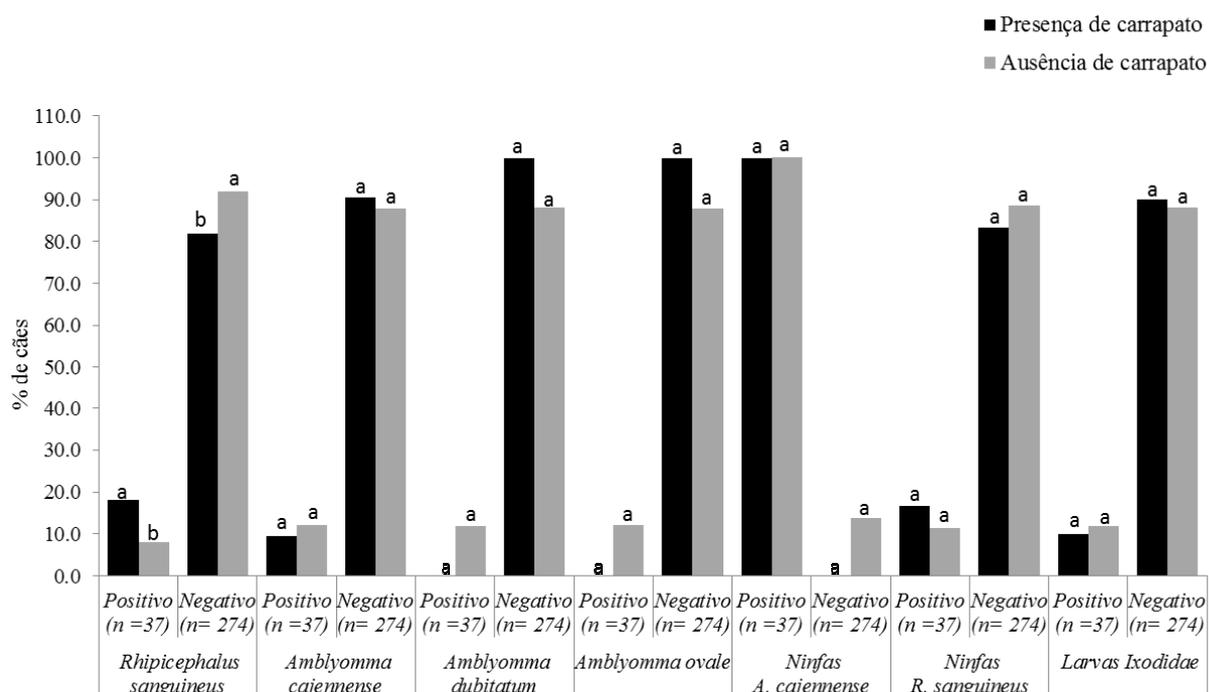


Figura 16. Frequência das diferentes espécies de carrapatos em cães positivos e negativos para *Babesia canis* no município de Seropédica, pela PCR em tempo real.

Avaliando-se o nível de infestação por carrapatos em função da positividade dos cães na PCR, verificou-se que dos 37 animais positivos, 31 (83,78%) estavam infestados, apresentando uma frequência de 17,71% (n=17/96) nos cães com grau de infestação baixa, 14,29% (n=7/49), naqueles com infestação moderada e 21,21% (n=7/33) nos cães alta infestação. Não houve associação ($p>0,05$) entre o grau de infestação e o resultado positivo na PCR, apesar da maior frequência observada entre o maior grau de infestação e o referido resultado. O nível de infestação foi avaliado no geral, independentemente das espécies de carrapatos encontradas sobre os cães (Tabela 12).

Tabela 12. Grau de infestação por carrapatos e diagnóstico positivo para *Babesia canis* através da PCR em tempo real.

Grau de infestação por carrapatos	Diagnóstico de <i>B. canis</i> em sangue de cães pela PCR em tempo real			
	Positivo	% Positividade	Negativo	Total
Baixo	17	17.71 ^a	79	96
Moderado	7	14.29 ^a	42	49
Alto	7	21.21 ^a	26	33
Total (p=0,7153)	31	17.42	147	178

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

4.3 Diagnóstico de *Babesia canis* pela Técnica de PCR em Tempo Real em Amostras de Carrapatos de Cães do Município de Seropédica, RJ

A técnica de PCR em Tempo Real utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A e PIRO-B foi utilizada para avaliar a presença de um fragmento de 400pb do gene *18s RNA* de *B. canis* em 240 amostras de DNA total extraídos de carrapatos. A PCR foi realizada em 197 amostras de *R. sanguineus* (101 fêmeas, 84 machos e 12 “pools” de cinco ninfas), em 15 amostras de *A. cajennense* (nove fêmeas e seis machos), em oito amostras de *A. ovale* (cinco fêmeas e três machos) e em 20 ninfas de *A. cajennense*.

A frequência de carrapatos positivos para *B. canis* foi de 5% (n=12/240). O DNA de *B. canis* foi detectado em nove carrapatos adultos de *R. sanguineus* com frequência de 1,67% (n=4/240) em machos e 2,08% (n=5/240) em fêmeas. O DNA também foi detectado em uma fêmea de *A. cajennense* com frequência de 0,42% (n=1/240) e em duas ninfas da espécie, com frequência de 0,83% (n=2/240). Avaliando-se a positividade para *B. canis*, em relação ao número total de carrapatos de uma mesma espécie observaram-se os seguintes valores: *R. sanguineus* com 4,57% (n=9/197) dos carrapatos positivos, 6,67% (n=1/15) para adultos da espécie *A. cajennense* e ninfas de *A. cajennense* com 10% (n=2/20). Considerando o total de carrapatos positivos para *Babesia* (n=12/240), 75% (9/12) foram *R. sanguineus*, 8,33% (n=1/12) adultos de *A. cajennense* e 16,67% (n=2/12) ninfas de *A. cajennense*. Relacionando a positividade dos 12 carrapatos à área de origem, 83,33% (n=10/12) foram obtidos de cães domiciliados em áreas rurais e 16,67% (n=2/12) em área urbana do município de Seropédica. As amostras urbanas positivas foram espécimes de *R. sanguineus*.

Comparando-se o diagnóstico positivo para *B. canis* nos carrapatos (n=12) com a positividade do mesmo agente em cães, ambos através da técnica de PCR em tempo real, constatou-se que dos nove carrapatos *R. sanguineus* positivos, apenas um exemplar veio de um cão positivo para *Babesia canis*. O único exemplar adulto positivo de *A. cajennense* positivo para *B. canis* foi colhido de um cão positivo para o agente, e as duas ninfas positivas também se originaram de cães positivos para *Babesia canis*. O DNA dos carrapatos foi extraído do carrapato na íntegra, contendo, portanto, sangue do hospedeiro (Tabela 13).

Tabela 13. Diagnóstico de *Babesia canis* através da técnica de PCR em tempo real em carrapatos e em cães.

Diagnóstico por PCR em tempo real em carrapatos (n=240)				
Carrapatos positivos para <i>Babesia canis</i>			Cão com <i>Babesia canis</i>	Cão negativo
Carrapato	n	%	n	n
<i>R. sanguineus</i>	9	75	1	8
<i>A. cajennense</i>	1	8,33	1	0
<i>A. cajennense</i> (ninfa)	2	16,67	2	0
Total	12	100	4	8

4.4 Comparações entre as Frequências de Resultados pelos Métodos de Esfregaço Sanguíneo, Sorológico por ELISA e PCR em Tempo Real

As lâminas com diagnóstico positivo para *B. canis* (n=3/311) foram confirmadas como positivas pela PCR em tempo real das amostras sanguíneas dos cães, cuja frequência nesta técnica foi de 11,90% (n=37/311) para *B. canis* e pelo método de ELISA, 12,54% (n=39/311).

5. DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do Ectoparasitismo em Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ

As características ambientais e a diversidade de espécies de hospedeiros de cada área são aspectos fundamentais para a existência de determinadas espécies de carrapatos nos cães. No Brasil, os principais hemoparasitas de cães são *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, e todos têm como vetor o carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Outras espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando os cães, tais como do grupo ovale (*Amblyomma ovale*, *A. aureolatum* e *A. tigrinum*) e por *A. cajennense*. No entanto, a ocorrência de diferentes espécies em diversas localidades é resultante das características epidemiológicas particulares de cada região (O'DWYER, 2000).

O município de Seropédica é pertencente à região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, apresentando peculiaridades comuns para as áreas rurais dos 19 municípios desta região. As áreas rurais do município estudado apresentam uma tênue separação da área urbana, principalmente devido sua pequena extensão e crescente expansão da urbanização para as áreas rurais. Este fato contribui para o fácil acesso dos proprietários e seus animais entre as duas áreas, facilitando a dispersão de hemoparasitos e vetores de uma área para outra. Além disso, nas áreas rurais cada vez mais tem sido verificada uma diferença nas formas de criação dos cães, com criação em canis ou outros abrigos em alvenaria, além da alimentação dos cães com ração comercial. Apesar disso ainda possuem características sociais, econômicas e ambientais de área rurais. Segundo a legislação 328/06 de 03 de setembro de 2006, sobre a criação do Plano Diretor de Seropédica, RJ, o município em questão divide-se em áreas rurais e urbanas, apesar de aspectos encontrados nas áreas rurais serem semelhantes aos de áreas peri-urbanas, enfatizando que mudanças nas características de urbanização estão em constante modificação, podendo futuramente tal denominação ser revisada.

De acordo com os resultados da presente pesquisa o município apresenta cães com alta frequência de ectoparasitismo nas áreas rurais e urbanas. Do total de 311 cães avaliados, foram observadas infestações por ectoparasitos (carrapatos, pulgas, piolhos, sarnas e bernes) em 252 (81,03%) cães no momento da coleta. O ectoparasita de maior frequência é o carrapato, seguido pela frequência de pulgas. Do total de cães com ectoparasitos, 70,64% (n=178/252) apresentaram-se infestados por carrapatos, 38,89% (n=98/252) por pulgas, 5,16% (n=13/252) por sarnas, 2,78% (n=7/252) por piolhos e 5,95% (n=15/252) por bernes.

Dantas-Torres et al. (2009) verificaram em seus estudos sobre os ectoparasitos que infestam cães rurais em Pernambuco, Brasil, que 41 cães de uma comunidade rural de Pernambuco foram examinados e 70,7% estavam infestados por ectoparasitos, sendo esta frequência menor que a encontrada no presente estudo. Os mesmos autores verificaram que as taxas de prevalência de infestação por carrapatos, pulgas e piolhos foram 58,5, 43,9 e 22%, respectivamente. Ainda no mesmo estudo, os autores verificaram que dos 24 cães parasitados por carrapatos, 15 estavam exclusivamente infestados por *Rhipicephalus sanguineus* (32 fêmeas, 66 machos, 9 ninfas; prevalência, 48,8%; intensidade média, 5,4), quatro por *Amblyomma ovale* (33 fêmeas, 19 machos; prevalência, 22%; intensidade média, 5,8), e cinco estavam co-infestados por ambas as espécies. *Ctenocephalides felis felis* (25 fêmeas, 8 machos; prevalência, 43,9%; intensidade média, 1,9) e *Heterodoxus spiniger* (16 fêmeas, 11 machos, 10 ninfas; prevalência, 22%; intensidade média, 4,1) foram as únicas espécies de pulga e piolho identificadas. A infestação por carrapatos foi mais frequente que as infestações por pulgas ou piolhos ($p < 0,05$), corroborando os achados do presente estudo. A espécie de piolho identificada no presente estudo foi diferente daquele e a prevalência de carrapatos foi muito superior.

O parasitismo por carrapatos ocorreu em 57,24% (n=178/311) dos cães avaliados. Dos 178 cães infestados por carrapatos, 123 (69,10%) pertenciam a domicílios localizados em áreas rurais e 55 (30,90%) a domicílios urbanos, destacando a importância dos estudos de transmissão de hemoparasitos, vetores e seus ecótopos nas áreas rurais, bem como os riscos aos quais os proprietários e seus animais estão expostos. O presente estudo verificou frequências maiores que os estudos de O'Dwyer et al. (2001), que detectou um parasitismo por carrapatos em 37,6% dos cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, sendo 23,6% por *A. cajennense* e 12,4% por *R. sanguineus*. Os achados desta autora reforçaram a teoria do domínio do *A. cajennense* em áreas rurais e do *R. sanguineus* em áreas urbanas e periurbanas observada em estudos prévios. De acordo com a autora, *R. sanguineus* cada vez mais está presente nas áreas urbanas e periurbanas e com a crescente expansão dos núcleos urbanos para as áreas rurais, a tendência é o aumento do parasitismo por esta espécie de carrapato neste meio.

Estudos desenvolvidos no Brasil, incriminam a espécie *R. sanguineus* como a responsável pela transmissão da babesiose canina tanto em nível de cidade como ao nível rural (O'DWYER et al., 2001). Esta espécie tem hábitos nidícolas, em sua fase de vida livre, podendo ser encontrada dentro de canis, no interior das residências e nos quintais das casas, escondendo-se em frestas e buscando abrigo em buracos das próprias instalações (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Tal fato está sendo cada vez mais frequente nas áreas rurais, visto que, contrário ao que acontecia em tempos passados onde cães de áreas rurais não possuíam abrigo. Atualmente muitos cães de áreas rurais possuem abrigos, feitos de alvenaria e com frestas, apresentando um bom habitat para este vetor que apresenta hábito nidícola, explicando o alto parasitismo por esta espécie nos meios rurais.

Quanto ao grau de infestação por carrapatos, o domínio foi de infestação baixa, porém uma pequena quantidade de carrapatos infectados é capaz de veicular o patógeno. Foi verificado que 53,93% (n=96/178) dos cães estavam infestados com menos de cinco carrapatos (infestação baixa), 27,53% (n=49/178) com cinco a 14 carrapatos (infestação moderada), 18,54% (n=33/178) com 15 ou mais carrapatos (infestação alta). *R. sanguineus* foi a espécie mais prevalente em ambas áreas rurais e urbanas, devendo-se destacar o fato desta espécie apresentar maior frequência dentre os carrapatos identificados no meio rural, apontando para um perfil diferente do parasitismo que ocorre em outros locais onde há maior prevalência de *A. cajennense*. Esta questão pode estar associada ao tipo de hábito que está sendo cada vez maior nas áreas rurais, que é o da construção de abrigos em alvenaria aliado ao grande nicho ecológico encontrado nas áreas rurais para realização do ciclo não parasitário do carrapato e hábito nidícola do *R. sanguineus*. Além disso, vale destacar que a separação tênue entre área urbana e área rural permite o constante deslocamento de cães entre estas áreas, explicando esse ectoparasitismo no meio rural.

O habitat do *R. sanguineus* foi descrito por Maroli et al. (1996) como sendo fundamentalmente constituído pelo ambiente urbano e peri-urbano, e teria o ninho do cão como seu local de predileção. Também responsabilizaram o aumento do número de cães no ambiente urbano e doméstico como sendo uma das causas da difusão numérica deste ixodídeo nas cidades. Em relação ao ciclo de vida deste vetor, afirmaram ter duração média de quatro a cinco meses, podendo, porém ser completado em apenas três meses dependendo das condições climáticas; é importante ressaltar que temperatura inferior a 18°C e umidade relativa do ar abaixo de 50% interferem no ciclo biológico do ixodídeo.

Em relação à infestação por carrapatos, *R. sanguineus* foi encontrado em 68,54% (n=122/178) dos cães, *A. cajennense* em 11,80% (n=21/178), *A. ovale* em 3,37% (n=6/178) e *A. dubitatum* em 0,56% (n=1/178) dos cães infestados por carrapatos. Ninfas de *R. sanguineus* e *A. cajennense* foram observadas em 13,48% (n=24/178) e 5,62% (n=10/178) dos cães infestados por carrapatos, respectivamente.

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* foram observados em sua maioria em cães domiciliados em áreas rurais (47,96%, n=60/123) do município de Seropédica, tendo somente um cão de área urbana com uma ninfa do gênero. Esperava-se no estudo encontrar maior número de cães parasitados pelo gênero em questão, visto a grande quantidade de equinos que transitam pelas áreas urbanas e presença de animais silvestres nos arredores das residências.

A frequência de cães parasitados por *R. sanguineus* diferiu significativamente entre os cães domiciliados em áreas urbanas e em áreas rurais, tendo maior frequência na área urbana (87,27%, n=48/55) que na área rural (60,16%, n=74/123), o que é esperado para a área urbana, com presença de frestas em paredes e canis, que constituem habitat adequado para o carrapato. As frequências destes achados diferem dos achados por Lemos et al. (1997), que realizaram estudo no município de Pedreira, área rural do Estado de São Paulo, e constataram que *A. cajennense* foi a espécie de ixodídeo predominante nos cães e representou 73,5% das infestações por carrapatos, enquanto que *R. sanguineus* significou apenas 26,5% deste percentual. A discordância encontrada no presente estudo em relação ao autor citado anteriormente pode ser explicado pela pequena extensão territorial do município de Seropédica, com limites pequenos entre os meios rural e urbano, onde a maioria dos cães do meio rural acompanham seus proprietários até o meio urbano, característica comum dos municípios da região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Este fato também justifica o alto parasitismo por *R. sanguineus* em cães de áreas rurais.

Os achados do presente estudo corroboram os achados de Labruna et al. (2001) que ao estudarem a frequência de carrapatos em cães da região norte do Estado do Paraná, observaram que apesar de ser em área rural, *R. sanguineus* foi a espécie mais prevalente, muito embora sua frequência tenha sido inferior em relação a estudos prévios realizados em áreas urbanas. Esse achado foi justificado pelo hábito nidícola deste ixodídeo, somado ao dos cães repousarem sempre no mesmo lugar, o que possibilitaria a essa espécie de carrapato se estabelecer na área rural.

Amblyomma sp. e *R. sanguineus* foram encontrados simultaneamente em 6,50% (n=8/123) dos cães domiciliados em áreas rurais, enfatizando a importância do cão como um hospedeiro capaz de albergar e carrear diferentes espécies de carrapatos.

Para os demais carrapatos foram encontradas as seguintes frequências para os meios rural e urbano, respectivamente: *Amblyomma ovale* (4,88% e 0), *A. dubitatum*, (0,81% e 0), ninfas de *A. cajennense* (30,89% e 1,82%) e ninfas de *R. sanguineus* (8,94% e 23,64%).

A ocorrência de diferentes espécies de carrapatos em cães em diversas localidades é resultante das características epidemiológicas de cada região. Em áreas urbanas a espécie mais encontrada em cães é *R. sanguineus* (LINARDI; NAGEM, 1973; MASSARD et al., 1981; RIBEIRO et al., 1997), fato que foi confirmado no presente estudo. Esse carrapato, originário de Velho Mundo e introduzido no Brasil durante a colonização, já se encontrava distribuído em todas as regiões geográficas do Brasil na década de 30 (ARAGÃO, 1936). Em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas (MASSARD et al., 1981; LABRUNA et al., 2000). Na região Sudeste, as espécies de *Amblyomma* mais frequentemente encontradas em cães de áreas rurais são *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense* (ARAGÃO, 1936; MASSARD et al., 1981). Neste estudo, a espécie *A. dubitatum* foi encontrada em cães que tinham acesso a áreas de mata onde foi constatada a presença de capivaras, o hospedeiro típico desta espécie de carrapato.

Os dados a respeito do ciclo biológico de carrapatos, em infestações naturais nos cães, são essenciais para o estabelecimento de medidas de controle. Dentre as variáveis estações do ano e comparação com a presença ou ausência de infestação por carrapatos observados nos cães durante o estudo pôde-se verificar associação ($p < 0,05$) entre a presença de infestação por carrapatos e o período do inverno. A primavera e o verão não apresentaram diferenças quanto à infestação. O percentual de infestação por carrapatos foi acima de 50% e esteve presente

durante todas as estações do ano. A presença constante dos hospedeiros ao longo do ano, ambientes adequados e a presença das fases não parasitárias podem explicar porque as variações nas condições climáticas não foram limitantes para o desenvolvimento de carrapatos.

A temperatura média anual da região estudada é de 24,5°C, com variação de 22 a 27°C, precipitação anual de 1.213 mm e umidade relativa média de 75%, com variação entre 70 e 80%. O clima é tropical subúmido com pouco ou nenhum déficit hídrico e mesotérmico com calor bem distribuído o ano todo. É classificado como Aw (clima tropical com estação seca de inverno e chuvas no verão) segundo o modelo de Köppen. Para a região, há concentração de chuvas entre os meses de novembro a março (CARVALHO et al., 2006). Nestas condições climáticas tropicais do Brasil, os carrapatos podem permanecer ativos durante quase o ano inteiro.

Louly (2003) em estudo analisando a dinâmica sazonal de *R. sanguineus* realizado em um canil de uma unidade de polícia localizado em Goiânia, Goiás, demonstrou que ixodídeos podem desenvolver até quatro gerações anuais, e infestações nos cães foram observadas durante todos os meses do ano, mas não verificou diferença significativa na contagem no que diz respeito às estações do ano.

Os achados do presente estudo demonstram maiores infestações nos períodos de outono e inverno e corroboram os achados de Silveira et al. (2009) que em estudo de verificação da dinâmica populacional de *R. sanguineus* em Belo Horizonte, MG, considerando o número total de carrapatos, observaram 4928 carrapatos nos cães durante a estação seca (inverno e outono) e 2390 carrapatos durante o período quente e chuvoso (primavera e verão). As taxas de infestação foram significativamente mais elevadas durante a estação seca ($p < 0,05$). Verificaram também a presença de carrapatos nos animais durante todo o período experimental de 12 meses, com os maiores graus de infestações nos meses de outubro e novembro (que compreende a primavera).

As maiores frequências de parasitismo por carrapatos encontradas no presente estudo para as épocas de outono e inverno também podem ser explicadas pelo fato da realização de menores quantidades de banhos nos cães, devido ao clima mais frio e, portanto, menor visualização dos carrapatos pelos proprietários, bem como menores tratamentos. Aliado a este fato, nestas épocas muitos cães procuram abrigos no intradomicílio o que facilitaria a infestação por carrapatos *R. sanguineus*, que apresentam hábitos nidícolas.

Na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Rodrigues et al. (2001) coletaram ectoparasitos de cães durante o inverno e o verão. Embora eles não tenham observado uma significativa diferença na frequência de contagem, é importante salientar que os cães incluídos neste estudo viviam nas ruas e sem qualquer cuidado.

As condições climáticas são fatores cruciais para o desenvolvimento do ciclo biológico de carrapatos e pode determinar sua frequência em diferentes populações hospedeiras em diferentes regiões geográficas. Maroli et al. (1996) confirmaram que *R. sanguineus* não desenvolve em temperaturas inferiores a 18 °C e umidade relativa inferior a 50%, entretanto, Silveira et al., 2009 verificaram em seus estudos em Belo Horizonte, MG que a temperatura mais baixa registrada foi de 16,6 °C e umidade relativa de 44% em maio de 2006, no entanto, observou-se a continuidade do ciclo, e todas as fases foram encontradas em cães, embora o mês de Maio tenha demonstrado a menor contagem de carrapatos coletados.

A variação sazonal de *R. sanguineus* observada em Belo Horizonte difere dos resultados de estudos desenvolvidos em outras cidades brasileiras (SILVEIRA et al., 2009)

Guimarães et al. (2011) em seus estudos em Lavras, Minas Gerais, verificaram que em relação à sazonalidade, 96% dos ectoparasitos (carrapatos e pulgas) foram observados entre os meses de setembro e janeiro (estação chuvosa). De acordo com GONZÁLEZ et al. (2004), *R. sanguineus* e *Ctenocephalides* sp. preferem os meses quentes e úmidos, sendo, portanto, mais

abundantes na primavera e no verão, com redução acentuada da população nos meses de outono e inverno.

No presente estudo pôde-se verificar associação ($p < 0,05$) entre a alta infestação por carrapatos e o período do verão. As demais estações do ano não apresentaram diferenças entre o grau de infestação ($p > 0,05$). Apesar disso, maior soropositividade foi associada aos meses mais frios. Independente do grau, a infestação por carrapatos foi observada durante todas as estações do ano.

Santos (2006) ao avaliar cães do CCZ de Santa Cruz, RJ, verificou associação significativa ($p < 0,05$) na prevalência de infestações por carrapatos no período seco foi de 1,38% e no período chuvoso (outubro a março) de 2,76%, corroborando os achados da presente pesquisa para o município de Seropédica, RJ, que apresenta características climáticas semelhantes. O mesmo autor ao avaliar durante um período de quatro anos a prevalência de hemoparasitoses em cães na mesma região, não verificou diferença estatística entre as prevalências do período seco e do período chuvoso.

Costa-Júnior et al. (2009) em estudos em Minas Gerais verificaram que baixas temperaturas na região de Lavras durante a estação seca resultou em baixa infestação dos cães por carrapatos e conseqüentemente baixa infecção dos cães por *Babesia canis*.

Em relação ao clima, Shakespeare (1995) observou variação sazonal na média de casos de babesiose canina com a ocorrência de um pico no verão e uma queda no inverno. Houve aumento dos casos clínicos mesmo antes das chuvas acontecerem, em Novembro, quando os termômetros marcaram uma média de temperatura máxima de 27,3°C.

Harvey et al. (1988) atribuíram a observação de alta infestação por carrapatos de cães de um canil da Flórida, à ocorrência de pluviosidade acima da média nos meses que precederam o mês de agosto.

5.2 Diagnóstico de *Babesia canis* através do Método Indireto pela Técnica Sorológica de ELISA (Ensaio Imunoenzimático de Adsorção) a partir de Amostras Séricas de Cães do Município de Seropédica, RJ

A prevalência da babesiose canina varia de acordo com o ambiente ao qual o animal reside, condições climáticas da região e alguns fatores epidemiológicos, tais como a distribuição dos vetores, média de idade da população estudada, práticas de manejo, perfil do proprietário, acesso a diferentes ambientes e contato com outras espécies animais, dentre outros.

A dificuldade de detecção do hemoparasita *B. canis* na fase crônica da doença conduz à pesquisa de anticorpos através do imunodiagnóstico (VERDIDA et al., 2004). As técnicas mais utilizadas neste tipo de diagnóstico indireto são a RIFI (Reação de Imunofluorescência indireta) e o ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), sendo a RIFI mais utilizada, por ser considerada de fácil execução e menos onerosa. Furuta (2004) comparou as duas técnicas no diagnóstico de babesiose canina e demonstrou que o método de ELISA teve maior sensibilidade, porém ressaltou que não existe a melhor técnica a ser utilizada para este diagnóstico, o que depende das condições para realização do mesmo.

O presente estudo demonstrou que a soropositividade para *Babesia canis* nos cães do município de Seropédica, RJ apresentou uma frequência de 12,54% ($n=39/311$), concordando com estudo similar realizado por Maia et al. (2007), onde a partir da RIFI obtiveram uma soroprevalência de 18,8% em cães.

Estudos realizados por Ribeiro et al. (1990), Dell'Porto et al (1993), Trapp et al. (2006), Oliveira et al. (2008) e Guimarães et al. (2009), observaram taxas de soropositividade mais elevadas comparadas ao presente estudo, variando de 36% a 73,3%. Entretanto, esta diferença foi esperada, já que os estudos comparados foram realizados somente em áreas

urbanas, onde a frequência do vetor *R. sanguineus* é alta e a babesiose é endêmica (PASSOS et al., 2005).

5.2.1 Fatores associados às características dos cães com diagnóstico positivo pelo método sorológico de ELISA para *Babesia canis*

Características inerentes aos cães, hábito e manejo destes animais são fatores importantes a serem avaliados em um estudo epidemiológico, visto que estas particularidades relacionadas ao hospedeiro podem demonstrar associação com o diagnóstico positivo para babesiose. Dentre os estudos relacionados ao diagnóstico de *B. canis* em cães, vigentes na literatura atual, poucos destacam os fatores associados à dinâmica de transmissão deste agente etiológico nos animais. Apesar de vários estudos envolverem a soroprevalência desse agente, grande parte destes são realizados em populações de cães oriundos de hospitais, clínicas veterinárias (MIRANDA et al., 2008; DUARTE et al., 2008) e centros de zoonoses (DELL' PORTO et al., 1993), com a presença de animais sintomáticos para babesiose.

Em relação à área de origem dos animais, no presente estudo observou-se que os cães de área rural foram os mais acometidos (21,56%, n=36/167, p<0,0001). No estudo, verificou-se que o ambiente rural possuía abrigos para os cães construídos em alvenaria, sem reboco, ou em alguns casos, com “chapisco” e formados por restos de construções (madeiras, zinco, telhas), favorecendo a presença do vetor *R. sanguineus*, que apresenta hábito nidícola. Em estudo realizado em cães de área rural, O'Dwyer (2000), observou prevalência de 41,10% no Estado do Rio de Janeiro, através de diagnóstico pelo método de RIFI. Muitas pesquisas realizadas no Brasil destacam principalmente a ocorrência do agente em cães procedentes de áreas urbanas, onde as taxas de prevalência variaram entre 33% e 67% (DELL' PORTO et al., 1993; DELL' PORTO, 1986; RIBEIRO et al., 1990; UNGAR DE SÁ et al., 2007). Desta forma, apesar da frequência observada ser mais elevada nos cães de área rural neste estudo, o valor observado foi mais baixo em relação a outras pesquisas, independente da área avaliada.

Contudo, vale destacar que alguns desses resultados obtidos nos estudos epidemiológicos citados, podem estar relacionados ao delineamento experimental presente nos tipos de pesquisa citados, que abordam principalmente animais com suspeita clínica para hemoparasitose (UNGAR DE SÁ et al., 2007).

A variável estação do ano foi verificada para a época do estudo encontrando-se maior percentual de positividade (p<0,05) para *Babesia canis* nos meses relacionados ao outono (27,91%), achado que está de acordo com a alta frequência de parasitismo por carrapatos na mesma época. Este fato é pouco comum, pois geralmente verifica-se maior frequência de babesiose canina nas épocas mais quentes e chuvosas. Cabe ressaltar que as coletas de amostras foram feitas de forma irregular quanto aos dias, intervalos entre coletas e quantidades de cães durante o período do estudo. As condições climáticas mantiveram-se ótimas e pouco demarcadas no decorrer de todo o estudo, com disponibilidade constante do hospedeiro, o que pode explicar a maior ocorrência de cães soropositivos no outono.

Costa-Junior et al. (2009) verificaram que durante a estação seca, a frequência global de anticorpos anti - *B. vogeli* na população canina em áreas rurais de Minas Gerais foi de 28,7% (70 de 244 animais).

Em relação ao gênero, não foi verificada associação com a soropositividade (COSTA-JUNIOR et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009; MAIA et al., 2007; UNGAR DE SÁ et al., 2007). Este achado pode estar relacionado ao fato de que a diferença entre os gêneros macho e fêmea não interfere na capacidade de infestação por carrapatos vetores, apesar de ambos terem alguns comportamentos diferentes, principalmente relacionados aos aspectos reprodutivos e marcação de espaço territorial, com maior movimentação dos machos, que, portanto ficariam mais expostos à infecção no ambiente.

Na categoria definição racial, houve associação estatística, sendo os cães sem raça definida os mais acometidos ($p < 0,05$), concordando com o estudo realizado por Maia et al. (2007), pois, diferente dos cães de raça, eles ficam mais soltos e seus donos não fornecem tantos cuidados em saúde e tratamento carrapaticida. Contudo, em outros estudos não foi observada diferença entre a soropositividade dos cães com raça e sem definição racial (COSTA-JUNIOR et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009). Além disso, no presente estudo verificou-se uma maior quantidade de animais avaliados na categoria sem raça definida, o que pode ter tendenciado estatisticamente este resultado.

A idade do animal foi um fator que apresentou associação com a soropositividade, sendo os cães com idade de seis meses a dois anos a categoria que apresentou maior frequência (20,59%, $n=14/68$), seguida de animais maiores que cinco anos (12,61%, $n=15/119$), e animais com idades de dois a cinco anos (9,52%, $n=10/105$). Esses dados corroboram os achados de Costa-Junior et al. (2009) e Guimarães et al. (2009), quando observaram que os cães com idades acima de dois anos apresentaram maior soropositividade. No presente estudo foi verificado também que animais abaixo de seis meses não apresentaram titulação para o agente, diferindo das demais categorias avaliadas. Este achado pode estar relacionado à menor mobilidade do animal para áreas com risco de infestação por carrapatos, menos tempo de exposição aos possíveis vetores, além do fato que muitas vezes, esta categoria de animal recebe maiores cuidados por parte dos proprietários, exibindo melhores condições sanitárias que as demais faixas etárias.

O comprimento do pêlo não apresentou associação com a soropositividade, apesar desta característica, possivelmente, conferir uma maior dificuldade na visualização pelos proprietários quanto à presença de carrapatos nos cães, limitando assim o tratamento e controle destes possíveis vetores. Da mesma forma, o porte dos animais não apresentou associação com a soropositividade ao piroplasma, apesar de que cães de grande e médio porte poderiam estar mais expostos aos carrapatos vetores, pois são animais que muitas vezes, permanecem fora do domicílio.

A alta infestação por ectoparasitos foi marcante, estando presente em 81,03% dos cães avaliados, mas não sendo observada associação estatística com a soropositividade dos animais para *B. canis*. Contudo, a presença de carrapatos foi observada em 57,23% ($n=178/311$) dos cães estudados, sendo esta variável associada à soropositividade, concordando com estudos realizados por Ionita et al. (2012), onde todos os animais positivos apresentaram carrapatos. Este achado está diretamente relacionado à transmissão vetorial de *B. canis* por carrapatos, e a presença destes carrapatos nos cães no momento da coleta sugere que estes podem estar participando diretamente na transmissão vetorial deste agente para os cães.

Apesar de a soropositividade estar associada à presença de carrapato, a falta de tratamento carrapaticida pelos proprietários não apresentou esta associação com a soropositividade dos cães. Este fato pode ser explicado pela falta de conhecimento sobre o manejo carrapaticida, onde os tratamentos eram realizados, muitas vezes de forma incorreta, com princípios ativos, modo de aplicação e intervalos inadequados, diluições incorretas, e o tratamento do animal ser realizado sem o tratamento simultâneo do ambiente.

A história pregressa de doenças causadas por agentes etiológicos transmitidos por carrapatos não apresentou associação com o resultado positivo na sorologia, o que pode ser explicado pela ausência de diagnóstico nos animais estudados, que em sua maioria, têm pouco acesso à assistência veterinária. Este aspecto deve ser levado em consideração juntamente com as características sócio-econômicas e culturais da região.

5.2.2 Fatores associados ao comportamento, hábito e manejo dos cães com diagnóstico positivo para *Babesia canis* pelo método sorológico de ELISA

Diversas pesquisas abordam alguns possíveis fatores associados à soropositividade de *B. canis* tanto no Brasil, como no Mundo (COSTA-JUNIOR et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009; MAIA et al., 2007; TRAPP et al., 2006a; UNGAR DE SÁ et al., 2007; IONITA et al., 2012; NALUBAMBA et al., 2011). Nestes destacam-se, em sua maioria, os fatores inerentes ao próprio cão, como sexo, idade e raça ou aspectos relacionados à peculiaridade de cada região estudada (IONITA et al., 2012; NALUBAMBA et al., 2011; COSTA-JUNIOR et al., 2009; MAIA et al., 2007). Entretanto, fatores associados ao comportamento, hábito e manejo dos cães podem estar diretamente interligados com a ocorrência da babesiose, uma vez que muitos destes fatores podem favorecer a infestação dos animais por carrapatos vetores.

Em relação à permanência do cão dentro ou fora da residência do proprietário, não foi verificada associação com a soropositividade do animal. Independente deste fato, animais criados dentro de casa contribuem para a característica inerente do principal vetor de *B. canis*, o carrapato *R. sanguineus*, que demonstra-se altamente adaptado ao ambiente domiciliar, favorecendo desta forma, a transmissão aos animais, não somente para aqueles que permanecem fora das residências, como também para aqueles que permanecem em seu interior (DANTAS-TORRES, 2010). Vale destacar que apesar de não haver associação, observou-se que a frequência de cães soropositivos foi menor nos animais que permaneciam dentro da residência. Animais que vivem o tempo todo dentro de casa geralmente apresentam maior contato com o proprietário, o que neste caso, facilita a visualização de carrapatos e consequentemente seu controle.

Contudo, para os cães que tiveram acesso a pastagem, observou-se associação com a soropositividade ($p < 0,0001$). Apesar do ambiente caracterizado como urbano e quintal, avaliado no estudo, ser considerado o mais comum para a ocorrência para *R. sanguineus*, vetor da babesiose canina, foi observada baixa frequência de soropositividade dos animais (3,65%, $n=5/137$). Vale destacar que a presença da espécie *R. sanguineus* nas áreas rurais do Município de Seropédica foi marcante, o que pode ter contribuído consideravelmente para a soropositividade dos cães à babesiose nestas áreas. E este fato pode estar relacionado à forte interação que existe neste município, entre as áreas rurais e urbanas, além do elevado deslocamento de pessoas e animais no seu interior, o que poderia favorecer a presença do vetor e consequentemente, da doença nas áreas rurais. No entanto, pouco se sabe sobre a transmissão, a ocorrência e os aspectos epidemiológicos da babesiose canina em áreas rurais do Brasil (COSTA-JUNIOR et al., 2009). Logo, existe a possibilidade da doença estar associada à presença de outras espécies de carrapatos vetores, que não são da espécie *R. sanguineus*. Labruna e Pereira (2001) observaram maior frequência do gênero *Amblyomma* em áreas rurais, em detrimento da espécie *R. sanguineus*, não sendo comprovada a transmissão do piroplasma por este gênero de carrapato, até o momento (COSTA-JUNIOR et al., 2009).

Além disso, foi observado que o contato de cães com outras espécies animais apresentou associação com a soropositividade ($p=0,0022$), ao contrário de estudos realizados por Trapp et al. (2006). Esta categoria pode estar relacionada ao acesso do animal a pastagem e cães sem abrigo na residência, justificando a associação à soropositividade. Do mesmo modo, o contato com outros animais que possam estar infestados com carrapatos infectados, pode realmente ampliar a possibilidade destes cães se infestarem com os possíveis vetores, aumentando as chances de infecção pelo protozoário.

Em adição, observou-se que cães que possuíam abrigo na residência, apresentaram menor frequência de soropositividade (3,23%, $n=6/186$), em relação aos cães sem abrigo

(26,40%, n=33/125). Isso pode estar relacionado ao fato de que muitos destes animais ficavam soltos a maior parte do tempo, o que estava associado à soropositividade (15,61%, n=37/237, p=0,0120). Desta forma, o acesso dos cães em locais em que ocorre o vetor, pode favorecer a infecção pelo agente etiológico. O contato com outros animais é uma variável importante para a manutenção da infestação, principalmente quando o tratamento do ambiente e do animal é deficiente, ou é realizado somente em alguns dos animais que vivem no mesmo ambiente, conforme observado também nos estudos de Maia et al. (2007).

Em relação ao tipo de ambiente que o cão passa maior parte do tempo, observou-se a maior soropositividade (31,45%, n=11/35) nos animais que permaneciam no ambiente de grama e/ou pasto. Este achado reforça a possibilidade de que possivelmente o animal se infecte também em locais onde a presença do principal vetor da doença é menos comum, destacando assim a possibilidade de outros possíveis carrapatos vetores.

Contudo, apesar desta associação de soropositividade e o contato do animal com este tipo de ambiente, deve-se salientar que foi observado também em muitas residências rurais, a presença de abrigos improvisados para os animais, o que realmente pode ter contribuído para a manutenção do principal vetor da doença, o carrapato *R. sanguineus* neste tipo de ambiente (DANTAS-TORRES, 2010).

As más condições de higiene do ambiente foram altamente significativas (p<0,0001), com maior frequência de soropositividade (32,50%, n=13/40) em ambientes com condição de limpeza ruim. Isso se deve ao fato de que o controle de vetores não é realizado somente com tratamento químico convencional no ambiente, mas também deve ser realizado por métodos físicos de limpeza. A cuidadosa observação das áreas com possibilidade de infestação por carrapatos no ambiente é um fator extremamente importante para o controle adequado da infestação, aliada ao tratamento do animal. No presente estudo foram observadas propriedades com a presença de grande quantidade de carrapatos em paredes e frestas, corroborando observações feitas por Dantas-Torres (2010), sendo este fato, muitas vezes, desconhecido por parte dos proprietários, que, portanto, não atuavam no controle do ectoparasito no ambiente.

Em relação à utilização de ectoparasiticidas no ambiente dos animais, observou-se que 14,48% (n=21/145) dos cães que vivem em ambiente sem tratamento foram soropositivos, em relação ao grupo de cães que vivem em ambiente tratado (10,84%, n=18/166, p=0,42). Este resultado pode estar relacionado ao mau uso dos produtos ectoparasiticidas por parte dos proprietários. Caprariis et al. (2010) observaram que a prevalência da babesiose por *B. canis vogeli* em cães que receberam tratamento acaricida foi 17,6%, enquanto nos animais não tratados a prevalência foi de 5,9%, justificando os achados do presente estudo relacionados à falta de manejo ou manejo incorreto, onde não houve diferença entre ambiente tratado e não tratado.

No quesito assistência veterinária, os cães que não recebiam assistência foram os mais soropositivos (19,13%, n=35/183). Da mesma forma, cães não vacinados apresentaram 21,79% de soropositividade (n=17/178). A falta de assistência veterinária pode contribuir para um controle ineficiente dos vetores, pois está relacionada à falta de informação para o proprietário e a ausência de vacinação, não atua diretamente na questão da positividade, mas está associada à questão da assistência veterinária em si, e aos cuidados do proprietário com a sanidade do animal. Além disso, animais que apresentam patologias concorrentes e imunidade deficiente são mais suscetíveis aos patógenos veiculados por carrapatos.

Em relação à origem do animal, apenas 9,67% (n=31/311) dos cães tiveram sua origem na rua, possuindo estes maior frequência de soropositividade, 25,81% (n=8/31), em relação às demais categorias. Estes animais abandonados (de origem errante) apresentaram maior frequência de positividade devido a maior exposição ao vetor, fato explicado pela sua maior movimentação em locais infestados, ausência de manejo carrapaticida e cuidados em saúde.

O histórico de infestação por carrapatos na propriedade dos animais foi relatado em 88,75% (n=276/311) dos cães, com frequência de soropositividade de 92,31% (n=36/39); o histórico de infestação na vizinhança dos cães que transitam nestas áreas apresentou frequência de soropositividade de 95,82% (n=298/311), e não apresentaram associação com a positividade à babesiose, apesar de serem as maiores frequências observadas nestas variáveis. Este fato pode ser verificado à medida que os proprietários não observam a infestação dos cães, principalmente quando é baixa ou até mesmo desconhecem o vetor e, além disso, alguns se sentem constrangidos de admitir que seu animal já se apresentara infestado, no momento que é entrevistado.

O tempo em que o cão está na propriedade, em contato com o ambiente e sob o manejo específico de cada proprietário, não influenciou na soropositividade dos animais. Este fato já era esperado, pois, independente do tempo do manejo, o animal pode se infectar em outro local que não o dele em questão, visto que muitos dos animais do estudo vivem soltos. Isto pode estar relacionado também a própria capacidade vetorial do agente da babesiose, onde apenas um espécime infectado pode veicular o patógeno ao cão.

5.2.3 Fatores associados aos aspectos clínicos dos cães com diagnóstico positivo para *Babesia canis* pelo método sorológico de ELISA

Os achados clínicos, juntamente com a anamnese são procedimentos fundamentais adotados por médicos veterinários a fim de se obter uma avaliação geral da saúde e do bem estar do animal que está sendo examinado. Entretanto, deve-se enfatizar que a maioria dos sinais clínicos observados na rotina de atendimento destes animais são inespecíficos para muitas enfermidades, fazendo-se necessária a realização de exames laboratoriais complementares para a elucidação do diagnóstico final.

Em relação aos principais aspectos clínicos observados na babesiose canina, destacam-se a ocorrência de febre, anorexia, depressão, oligúria, hemoglobinúria, vômito, letargia, desidratação, icterícia, mucosas pálidas, esplenomegalia e dispnéia (IRWIN, 2009). No presente estudo, apenas duas variáveis clínicas apresentaram associação significativa ($P < 0,05$) com a soropositividade para babesiose, o escore corporal e o comportamento do cão. Vale destacar que o estudo não foi direcionado somente para animais soropositivos para *B. canis*, ou com suspeita clínica de babesiose, mas sim para uma população canina selecionada de forma aleatória no município.

Cães com escore corporal magro apresentaram associação com a soropositividade para *B. canis*. A magreza é um aspecto que pode ser verificado em animais com babesiose, seja na fase aguda ou crônica, pois os cães são acometidos por anemia, febre, anorexia e depressão, os quais influenciam na condição corporal do animal (FURLANELLO et al., 2005). A inapetência é um sinal observado em casos de babesiose canina (FURLANELLO et al., 2005; TROTTA et al., 2009) variando a gravidade de acordo com a fase de infecção pelo parasita.

Da mesma forma, cães caracterizados com comportamento apático ou triste, apresentaram associação com a soropositividade. Estes achados corroboram os achados de Gopegui et al. (2007), os quais verificaram em seus estudos que 89% dos cães com babesiose apresentaram-se com letargia.

Entretanto, em relação aos demais sinais clínicos observados, não houve associação com a soropositividade. Estes dados são diferentes dos obtidos por Gopegui et al. (2007), que avaliaram cães com diagnóstico positivo para babesiose, os quais 60% apresentaram mucosas pálidas. Apesar de poucos sinais clínicos evidenciados nos animais positivos é importante destacar o aspecto subclínico que esta doença pode apresentar, e, portanto a ausência destes sinais nos cães infectados do estudo. Vale ressaltar também que a ausência de sinais clínicos

nos cães infectados pode estar associada com a subespécie de *B. canis* envolvida na infecção (CACCIO et al. 2002).

Braga (2011) observou que cães soropositivos para *B. canis*, através da RIFI, apresentaram como sinais clínicos mais frequentes: linfadenopatia (63,6%), alterações dermatológicas (42,4%), anorexia/hiporexia (31,1%), apatia (28,5%), emagrecimento (24,5%), febre (21,2%), desidratação (4,0%), edema (4,0%), hemorragias petequiais (2,0%), alterações nervosas (1,3%), icterícia (0,7%) e hemoglobinúria (0,7%).

Alguns estudos levantam a hipótese de que na infecção por *B. canis vogeli*, os cães não apresentam alterações clínicas significativas, exceto em casos de animais que estejam esplenectomizados ou com doenças concomitantes (TABOADA; LOBETTI, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2008). Vale destacar que, em estudo conduzido por Caprariis et al. (2010), as alterações clínicas e hematológicas ocorreram principalmente em animais co-infectados por *B. canis vogeli* e *A. platys*, quando comparados àqueles infectados apenas por *B. canis vogeli*, revelando que a co-infecção entre os agentes pode agravar o quadro clínico e deve ser uma questão considerada na realização do diagnóstico em áreas endêmicas.

5.2.4 Características das propriedades visitadas

O município de Seropédica apresenta um tipo de urbanização bastante típico de áreas em transição do meio rural para o meio urbano, com pouca infraestrutura na sua urbanização. No município é comum observarem-se criações de animais de produção no perímetro urbano, bem como remanescentes de matas e pastagens nesta área. A área rural apresenta-se com propriedades em sua maioria de pequeno a médio porte, em sua maioria com forte tendência urbana no que concernem os tipos de construções. Em relação ao ambiente, há muitas pastagens, áreas de vegetação rasteira e áreas de mata com presença de animais silvestres. Uma característica das áreas rurais dos municípios da região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro é o estreito limite entre a área rural e a urbana, com expansão da urbanização para as áreas rurais. O município do presente estudo é de pequena extensão, permitindo fácil interação de animais entre esses meios e com isso seus vetores e patógenos.

Foram visitadas 113 residências e/ou propriedades nas zonas rurais e urbanas localizadas no município de Seropédica, sendo 51,32% localizadas em áreas rurais e 48,67% em áreas urbanas. No presente estudo observou-se que 36,21% (n=21/58) e 5,45% (n=3/55) dos domicílios rurais e urbanos, respectivamente, tinham cães soropositivos. Houve forte associação entre a soropositividade do cão para *Babesia canis* e a área de domicílio no meio rural. Estes resultados sugerem que os cães que vivem em áreas rurais estiveram mais expostos aos carrapatos vetores do que os que vivem em áreas urbanas. Além disso, pode-se inferir que os animais de áreas urbanas sejam tratados com maior frequência com acaricidas, enquanto que os animais de áreas rurais recebem menos cuidados e poucas vezes são tratados com acaricidas, ou o são, porém com acaricidas utilizados para animais de produção, que apesar de muitos poderem ser utilizados, são manejados de forma incorreta por falta de conhecimento do proprietário.

Em relação ao número de propriedades visitadas verificou-se que 21,24% (n=24/113) delas possuíam pelo menos um cão soropositivo. Quanto ao número de cães nas propriedades, 61,06% (n=69/113) destas possuíam dois a quatro cães, 13,27% (n=15/113) possuíam cinco ou mais animais e 25,66% (n=29/113) somente um animal. Pôde-se verificar que propriedades com maior número de cães, muitas vezes têm maior dificuldade para manutenção do manejo correto e, portanto, apresentaram maior infestação por carrapatos.

Quanto ao tipo de residência, 99,11% (n=112/113) era construída de alvenaria, que sem os devidos cuidados com o manejo acaricida no ambiente tornam-se grandes habitats para o ciclo não parasitário de carrapatos, principalmente se há frestas, tijolos sem reboco e reboco

em chapisco. A falta de métodos físicos de limpeza, como por exemplo, uso de vassoura de fogo e até mesmo o simples ato de varrer o local do animal, foi observado na grande maioria das propriedades.

O tipo de vegetação mais frequente no entorno da propriedade foi relacionado à presença de jardim (40,71%, n=46/113), tendo em algumas propriedades, árvores frutíferas de pequeno a médio porte. Foram observadas nas residências, grandes quantidades de exemplares fêmeas de carrapatos e suas posturas principalmente nas frestas e paredes de chapisco, além da presença em vasos de plantas ornamentais. Este fato foi observado independente da condição econômica dos proprietários, os quais todos desconheciam sobre o ciclo do carrapato. Os demais tipos foram: ambientes sem vegetação (26,55%, n=30/113), ambientes com mata ao redor da propriedade (23,01%, n=26/113), propriedades com áreas de pastagem com resquícios de mata (7,96%, n=9/113) e propriedades somente arborizadas (1,77%, n=2/113). Ambientes sem vegetação em sua maioria não apresentaram infestação, pois destes, muitos eram ladrilhados ou cimentados e eram lavados constantemente, mas houve ambientes com estas características que apresentaram infestação ambiental. Ambientes com mata ou pastagens ao redor foram aqueles nos quais os proprietários tiveram mais reclamações acerca da presença de carrapatos e da dificuldade do controle de carrapatos no ambiente e nos animais.

Nota-se que o município apresenta-se inserido numa grande área com remanescentes de mata ao redor, além da presença de um parque florestal de reabilitação de animais silvestres, onde 61,95% (n=70/113) dos proprietários relataram presença de animais silvestres no entorno da propriedade e 38,05% (n=43/113) não, sendo 77,14% (n=54/70) destes representados por gambás, pequenos roedores e répteis, 11,43% (n=8/70) por gambás e pequenos primatas, 10% (n=7/70) por capivaras, gambás e répteis, e 1,43% (n=1/70) por aves silvestres. A presença de animais silvestres ocorreu também na área urbana do município, onde muitos deles vão em busca de alimentos e apresentam contato com seus animais de estimação e com o ambiente onde os mesmos vivem. O tipo de área com animais silvestres no entorno foi caracterizada como rural em 58,57% (n=41/70) das propriedades e como área urbana em 41,43% (n=29/70). A maioria dos proprietários desconhecia a possibilidade de veiculação de patógenos entre os animais silvestres e seus cães, bem como de seus vetores e possíveis agentes zoonóticos.

5.2.5 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção e perfil dos proprietários

A percepção e o perfil dos proprietários são importantes fontes para o estudo epidemiológico, bem como servem de meios para o diagnóstico da situação e consequentemente da tomada de decisões frente ao problema e retorno de informações e educação sanitária.

Em relação à informação que o proprietário possui sobre os riscos dos carrapatos, 74,33% (n=84/113), estavam cientes sobre os riscos, e 25,66% (n=29/113) não tinham conhecimento sobre os riscos, e quanto à informação sobre doenças transmitidas por carrapatos, 70,23% (n=59/84) desconheciam o assunto, e 29,76% (n=25/84) detinham o conhecimento. Grande parte dos proprietários entende como riscos decorrentes dos carrapatos somente o fato do ectoparasito fazer espoliação sanguínea. Alguns deles, não sabiam que a quantidade de sangue espoliada seria suficiente para causar anemia. Estes dados evidenciam a grande dificuldade no controle de doenças transmitidas por carrapatos, além dos perigos aos quais o homem e seus animais estão expostos. O parasitismo por carrapatos em pessoas, na área de criação dos seus animais, ocorreu em 50,44% (n=57/113) dos entrevistados, e 49,55% (n=56/113) relataram não terem sido parasitados por carrapatos. Este dado pode ter sido

subestimado, visto que em sua maioria, o parasitismo por carrapatos não é notado pela pessoa, ou é tratado como algo normal, e, além disso, alguns entrevistados relataram não saber exatamente a diferença entre pulgas e carrapatos. Este relato foi independente da classe social, porém pessoas com nível de escolaridade mais elevado souberam diferenciar melhor os ectoparasitos. Harrison et al. (1997) demonstraram que *R. sanguineus*, principalmente as suas formas imaturas, alimentam-se em humanos com grande frequência e assim, por desenvolverem-se em ambientes sinantrópicos, com altas densidades e prevalências, esse carrapato pode vir a causar aumento na incidência de zoonoses transmitidas.

Diante das mudanças no estilo de vida, o cão tem um contato cada vez maior com o homem, expondo este aos agentes comuns entre essas duas espécies. Vale ressaltar que *R. sanguineus* é o vetor para humanos na Europa da *Rickettsia conori*, agente da febre botonosa (MERLE et al., 1998), e potencial vetor da *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa no Brasil (ROZENTAL et al., 2002), e da borreliose de Lyme símile no Brasil (YOSHINARI et al., 1997).

O nível sócio econômico foi um parâmetro medido por observação, encontrando-se 53,09% (n=60/113) na classe média, 39,82% (n=45/113) na classe baixa e 7,07% (n=8/113) na classe alta. Foi observado nas propriedades de classe baixa, um maior número de animais, sendo relatado pelos proprietários problemas como dificuldades para manejo carrapaticida e dificuldade financeira para esterilização dos animais. Algumas práticas de manejo empíricas eram adotadas pelos proprietários como o uso de óleo queimado no combate de ectoparasitos, dipirona sódica em gotas para combate de carrapatos, uso de compostos a base de cresóis no combate de carrapatos, entre outros.

O grau de escolaridade dos proprietários ficou enquadrado como: 35,39% (n=40/113) não esclareceu sobre o assunto, 18,58% (n=21/113) tinham o 1º grau incompleto, 6,19% (n=7/113) tinham o 1º grau completo, 1,76% (n=2/113) tinham o ensino médio incompleto, 8,84% (n=10/113) tinham o ensino médio completo, 1,76% (n=2/113) tinham o nível superior incompleto e 22,12% (n=25/113) tinham o nível superior completo. Apesar de grande parte dos entrevistados apresentarem nível superior completo, foi verificado que as informações acerca da saúde animal relacionada também à saúde humana eram um assunto que a maioria desconhecia. Sobre informações a cerca deste assunto, todos relataram que na escola nunca foram informados, tendo informações somente quando levam o cão ao veterinário. Poucos entrevistados relataram buscar na internet sobre o manejo e doenças nos cães.

O uso de ectoparasiticidas no ambiente de criação dos animais ocorria em 29,20% (n=33/113) das propriedades e 70,80% (n=80/113) delas, não realizavam este manejo. O uso dos ectoparasiticidas não possuía critério estabelecido por parte dos proprietários, ou seja, era realizado de forma incorreta na escolha do produto, no método de aplicação, diluição e frequência entre as aplicações. Estes dados demonstram que a maioria dos proprietários desconhecia o fato de ter que realizar o manejo no ambiente e nos cães deste ambiente. Foi observado que alguns proprietários que possuíam cães de raça e cães sem raça definida realizavam o manejo de forma diferenciada, tratando os de raça e deixando os demais sem tratamento. As classes químicas dos produtos utilizados foram as seguintes: 36,36% (n=12/33) das propriedades utilizavam compostos piretróides, 33,33% (n=11/33) utilizavam piretróides, amidinas e organofosforados, 18,18% (n=6/33) utilizavam piretróides e amidinas, 12,12% (n=4/33) utilizavam somente amidinas. A utilização de piretróides no ambiente ocorre na maioria das propriedades e segundo relatos de alguns proprietários, em sua maioria não faz efeito, portanto, pôde-se verificar certa resistência dos ectoparasitos a estes compostos devido ao uso indiscriminado dos mesmos.

5.2.6 Características das propriedades visitadas relacionadas à percepção dos proprietários quanto à orientação clínica e manejo dos animais

Segundo informações dos proprietários em relação à assistência veterinária dos cães, 41,15% (n=128/311) dos cães estudados, apresentavam assistência. A maior frequência de assistência foi a cada seis meses (44,53%), porém grande quantidade (39,06%) somente quando o animal apresentava-se doente. Este resultado demonstra a importância da assistência veterinária regular, pois ainda é grande a quantidade de assistência somente quando os cães ficam doentes, demonstrando a ausência do caráter preventivo em relação à saúde do animal.

A alimentação dos cães era feita por ração comercial em 33,12% (n=103/311) dos cães, por comida caseira em 11,90% (n=37/311) e por ambas (ração e comida caseira) em 54,98% (n=171/311) dos cães. Este fato mostra que grande quantidade dos animais pode apresentar-se com deficiências nutricionais e principalmente com deficiências imunológicas, devido à alimentação sem adequado balanço nutricional.

O tratamento carrapaticida era realizado em 64,31% (n=200/311) dos cães e 35,69% (n=111/311) dos cães não recebiam este tratamento, sendo o critério para estabelecimento do tratamento feito por veterinário em 31% (n=62/200) dos cães, por balconista em 10% (n=20/200) dos cães, por indicação de leigos em 20% (n=40/200) dos cães, por propaganda em 3,5% (n=7/200) dos cães, e não prestaram esclarecimento sobre o critério de escolha, os proprietários de 35,5% (n=71/200) dos cães. Estes resultados chamam atenção para o fato da indicação por veterinário ser suplantada por outras indicações, o que justifica o grande parasitismo por carrapatos (presente em 178 dos 311 cães estudados), confirmado pela ausência, ou pelo manejo incorreto realizado para o controle de carrapatos, seja no ambiente, seja no animal.

5.3 Diagnóstico de *Babesia canis* pela Técnica de PCR em Tempo Real a partir de Amostras Sanguíneas de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ

A análise das amostras sanguíneas de cães pela técnica de SYBR Green PCR em tempo real resultou em 37 amostras positivas para *Babesia canis*. Das amostras positivas, 23 (62,16%) eram de cães de área rural e 14 (37,84%) de área urbana. O valor médio do C_T observado nas amostras positivas foi de $28,17 \pm 4,47$, variando entre 20 (mínimo) e 35 (máximo). Na literatura há poucos dados em relação à aplicação desta técnica nos estudos de *Babesia* em cães, porém há recentes estudos utilizando a técnica, inclusive no Brasil. Schaarschmidt et al. (2006) utilizaram a técnica apenas para verificar a positividade em cães; Matsuu et al. (2005) realizou análise quantitativa de DNA de *B. gibsoni* isolada em cães utilizando esta mesma técnica; Esta técnica é avaliada como sendo um avanço nos estudos de epidemiologia da babesiose em cães, por ser uma técnica mais sensível de diagnóstico, capaz de demonstrar a quantidade (por ser técnica quantitativa) de material genético presente na amostra, além da vantagem da facilidade de não haver necessidade de realização de eletroforese em gel de agarose para visualização dos resultados. A técnica com suas adaptações e observações pode também ser utilizada em estudos de taxonomia e no diagnóstico de subespécies do gênero sem a necessidade de realizar RFLP (ADASZEK; WINIARCZYK, 2010). Costa-Júnior et al. (2012) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico das três subespécies de *B. canis*, e encontraram uma frequência de 9,9% em cães de áreas rurais de Minas Gerais, verificando que a subespécie encontrada nesta região foi *B. canis vogeli*. Vale ressaltar que a técnica é bastante avançada, rápida, sensível, porém de alto custo de aparelhagem e reagentes, o que dificulta sua utilização para o diagnóstico da babesiose em clínicas. Maiores possibilidades de emprego da técnica no

diagnóstico na clínica podem surgir com a criação de laboratórios centralizados especializados em diagnóstico.

5.3.1 Diagnóstico de subespécies de *Babesia canis* pela técnica de RFLP a partir de DNA amplificado pela PCR em tempo real de cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, RJ

A PCR-RFLP permite a distinção de subespécies de *B. canis*, confirmando a separação dos mesmos, a qual tem sido baseada em outros critérios como especificidade de vetor, imunidade cruzada, sorologia e patogenia. A diferenciação molecular pode ser de particular interesse no desenvolvimento de vacinas contra a babesiose, visto que as vacinas geralmente falham a campo devido à heterogeneidade entre as subespécies de *B. canis* (CARRET, 1999).

Das 311 amostras sanguíneas de cães testadas pela PCR em tempo real, 37 (11,90%) apresentaram-se positivas. A digestão com *TaqI* apresentou separação em dois fragmentos com aproximadamente 200pb e 280pb, resultando neste caso, em *Babesia canis vogeli*. Esta enzima não separa fragmentos de *Babesia canis canis* e *B. canis rossi*, e portanto, os fragmentos referentes à estas subespécies ficariam em torno de 400 pb (CARRET, 1999), o que não foi visualizado, e portanto, não há amostras que apresentem estas duas subespécies. Nesta digestão foram visualizados também fragmentos com tamanho em torno de 500 pb, suspeitos de *Hepatozoon canis*, que corroboram os achados de O'Dwyer et al. (2009) e Lisboa (2010), os quais utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos (PIRO A e PIRO B) obtiveram os mesmos resultados, confirmando os achados mediante sequenciamento das amostras obtidas.

Costa-Júnior et al. (2009) em seus estudos com cães de três áreas rurais do estado de Minas Gerais verificaram que a subespécie envolvida na babesiose canina foi *Babesia canis vogeli*. Estudos moleculares prévios em cães de áreas urbanas no Brasil demonstraram que o agente envolvido em todos os casos foi *Babesia canis vogeli* (PASSOS et al., 2005). Entretanto, alguns casos de infecção pela subespécie *Babesia canis gibsoni* foram molecularmente caracterizados no Brasil (TRAPP et al., 2006).

Jojima et al. (2008) verificaram em seus estudos numa população de 282 cães com sinais clínicos para babesiose em um hospital veterinário de Londrina, Paraná, que a PCR-RFLP identificou 66 amostras (23,4%) com perfil de clivagem compatível com *B. canis vogeli* e 39 (13,8%) com *B. gibsoni*.

A digestão com *HinfI* não apresentou separação em bandas para as amostras avaliadas e, portanto, como a enzima faz a digestão em dois fragmentos para a subespécie *B. canis rossi*, nas amostras em estudo não houve a presença desta subespécie em questão. Neste processo também foram observados fragmentos com aproximadamente 500pb, como mencionado anteriormente.

Birkenheuer et al. (2003) assinala a importância de se diagnosticar as espécies, subespécies e genótipos que causam a babesiose canina, uma vez que a virulência, prognóstico e resposta às drogas babesicidas podem ser diferentes para cada microrganismo.

Pouco tempo antes da primeira caracterização molecular de *B. canis vogeli* realizada por Passos et al. (2005) a partir de amostras de São Paulo e Minas Gerais, Bicalho et al. (2002) produziram infecção experimental com amostras de *B. canis* isoladas de Minas Gerais e observaram baixa parasitemia associada à ausência de manifestações clínicas, o que os levou a concluir que as amostras presentes naquele meio exibiam baixa patogenicidade.

No presente estudo, pode-se inferir que as amostras de *B. canis vogeli* exibiram baixa patogenicidade nas frequências e achados clinicopatológicos descritos neste estudo, considerando a ocorrência de variações de cepas entre regiões.

5.4 Comparações de Resultados pelo Método de Esfregaço Sanguíneo, Sorológico de ELISA e PCR em Tempo Real

As lâminas com diagnóstico positivo para *B. canis* (n=3/311) foram confirmadas como positivas pela PCR em tempo real das amostras sanguíneas dos cães. Dentre as amostras analisadas, em 0,96% foi identificada a presença de *Babesia canis* no esfregaço sanguíneo, enquanto que 11,90% das amostras foram positivas na PCR e 12,54% positivas no ELISA. Estes achados diferem dos achados de Vasconcelos (2010) que achou frequências mais altas nos dois primeiros métodos (1,6% e 22,99%) quando estudou cães de regiões periurbanas de Brasília, DF.

O' Dwyer (2000) em seu trabalho de diagnóstico de hemoparasitos e carrapatos em cães de área rural em três mesorregiões do RJ pelo método de esfregaço sanguíneo verificou que, 45,2% dos cães apresentaram-se positivos para hemoparasitos, sendo que a positividade variou de 11,5% em Mangaratiba a 71,8% em Pirai. *Babesia canis* foi observada em 5,2% dos cães. Com relação à prevalência, a região de maior prevalência foi a de Mangaratiba (63,6%) e a de menor prevalência foi Miguel Pereira (20%).

Bobade et al. (1989) verificaram em seus estudos de babesiose canina na Nigéria uma frequência de 43% de soropositividade através de diagnóstico pelo método de ELISA, com menor prevalência em cães de 1 a 6 meses, porém foram detectados anticorpos em alguns filhotes nascidos de cadelas soropositivas.

A discrepância entre os resultados da PCR em tempo real e da análise microscópica de esfregaços sanguíneos no presente trabalho 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 de avaliação por esfregaço sanguíneo para a detecção da infecção por *Babesia* spp. e pode ainda ser utilizado para diferenciar as subespécies que não podem ser diferenciadas morfológicamente pelo método do esfregaço sanguíneo (SÁ et al., 2006).

Comparando os resultados do presente estudo aos resultados de Braga (2011) que estudou a babesiose canina em cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em Teresina, Estado do Piauí, verificaram que a positividade dos animais foi de 48,57% (153/315) à RIFI, 4,76% (15/315) à PCR e 2,22% (07/315) ao esfregaço sanguíneo, observando que apenas no diagnóstico pela PCR em Tempo Real a frequência apresentou-se maior.

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 canis*, *Hepatozoon sp.* e *Ehrlichia canis* (MUNDIM et al., 2008; SANTOS et al., 2009; GONDIM et al., 1998; O'DWYER; MASSARD, 2002). Em muitos casos, a infecção por *Babesia* sp. pode ser agravada pela presença de outros hemoparasitas nos cães (BOOZER; MACINTIRE, 2003). Dentre os cães avaliados, no presente estudo, as frequências de co-infecções pelo método de esfregaço sanguíneo foram: 0,32% (1/311) estava co-infectado por *B. canis* e *E. canis*, 0,32% (n=1/311) co-infectado por *A. platys* e *E. canis*, 0,32% (n=1/311) por *E. canis* e *H. canis* e 0,32% (n=1/311) por *A. platys*, *B. canis* e *E. canis*. A co-infecção por *B. canis* e *E. canis* ocorreu em 3,54% (n=11/311) e 8,04% (n=25/311) dos cães avaliados.

Ruas et al. (2002) ao examinarem esfregaços sanguíneos de canídeos silvestres do sul do Brasil encontraram *Babesia* spp, em um animal e sugeriram que essa transmissão tenha

sido efetuada por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp, pois somente este ixodídeo foi visualizado nos animais.

Vargas-Hernández et al. (2012) em seus estudos na Colômbia verificaram que embora a detecção molecular de *B. canis vogeli* em seus estudos tenha sido baixa (5,4%), a soroprevalência pela técnica de RIFI encontrada foi de 51,6%, indicando uma exposição prévia ao agente. Ao comparar os achados, no presente estudo, foi verificada uma frequência de 11,9% através de detecção molecular, superior à encontrada por este autor, indicando uma fase clínica, de parasitemia da doença, apesar dos cães não demonstrarem sinais clínicos, o que é explicado pela forma branda de sintomatologia desta subespécie em questão. Quando as amostras foram submetidas ao diagnóstico sorológico pelo método de ELISA, foi verificada uma frequência de 12,54%, menor que a encontrada pelo autor na Colômbia.

Apesar da PCR ser considerada uma técnica altamente sensível e específica, a sua sensibilidade é baixa quando amostras de sangue são coletadas de cães assintomáticos na fase crônica da doença (BOOZER; MACINTIRE, 2003). Isto pode ser explicado pela flutuação da parasitemia (IRWIN, 2009). No presente estudo, a presença de cães soropositivos mostrando resultados negativos na PCR sugere a ocorrência da fase subclínica ou crônica da doença nesses animais, ou seja, estes mesmos cães poderiam ter sido previamente expostos a *B. canis vogeli*, mantendo os anticorpos a níveis detectáveis. Além disso, a positividade no esfregaço de sangue associada com resultados positivos em PCR sugere a ocorrência de uma fase aguda da doença, em que uma parasitemia foi detectável.

5.5 Avaliação do Ectoparasitismo em Cães e Associação com Diagnóstico Positivo para *Babesia canis* em Amostras Sanguíneas de Cães através da PCR em Tempo Real

A Infestação por ectoparasitos foi observada em 91,89% (n=34/37) dos cães positivos na PCR em tempo real para *B. canis*. Em 83,78% (n=31/37) dos cães positivos verificou-se a presença de carrapatos nos cães no momento da coleta, que teve associação (p=0,0010) com a infecção por *B. canis*, apresentando uma frequência de positividade de 17,42% (n=31/178). Os animais sem carrapatos (16,22% dos positivos) no momento da coleta apresentaram a frequência de positividade de 4,51% (n=6/133). Estes dados demonstraram a importância da presença de carrapatos relacionada à positividade no cão, porém animais sem carrapatos no momento da coleta também se apresentaram infectados, porém com menor frequência.

A espécie de carrapato mais frequente nos cães positivos foi *R. sanguineus* (59,46%, n=22/37), sendo a única que apresentou associação (p=0,0122) com a positividade para *B. canis*, corroborando estudos anteriores que afirmam que este é o vetor deste patógeno no Brasil, e o principal agente etiológico da babesiose canina é *B. canis vogeli*, associado à alta incidência do carrapato vetor *R. sanguineus* (PASSOS et al., 2005; VIDOTTO; TRAPP, 2004), que apresenta prevalência e intensidade de infestação crescentes em todo país (LABRUNA, 2004).

As demais frequências de carrapatos nos cães positivos foram: ninfas de *A. cajennense* (18,92%, n=7/37), ninfas de *R. sanguineus* (10,81%, n=4/37), *A. cajennense* (5,41%, n=2/37) e larvas de Ixodidade (2,7%, n= 1/37). Co-infestações por *A. cajennense* e *R. sanguineus* foram observadas em 8,11% (n=3/37) dos cães positivos. Avaliando a positividade para *B. canis* em função da espécie de carrapato encontrada sobre os cães, observou-se que 18,03% (n=22/122) estavam infestados com *R. sanguineus*. Avaliando-se o nível de infestação por carrapatos em função da positividade dos cães na PCR, verificou-se que dos 37 animais positivos, 31(83,78%) estavam infestados, apresentando uma frequência de 17,71% (n=17/96) nos cães com grau de infestação baixa, 14,29% (n=7/49), naqueles com infestação moderada e 21,21% (n=7/33) nos cães com alta infestação. Não houve associação (p>0,05) entre o grau de infestação e o resultado positivo na PCR, apesar da maior frequência observada entre o maior

grau de infestação e o referido resultado. O nível de infestação foi avaliado no geral, independentemente das espécies de carrapatos encontradas sobre os cães.

B. canis vogeli está distribuída mundialmente, e principalmente onde haja a presença do carrapato vetor *R. sanguineus*, em diferentes locais com diversas características bioclimáticas especialmente onde existam cães, pelo fato de seu hábito de alimentação, sendo este, o principal carrapato de cães de zona urbana (RIBEIRO et al., 1997; SHAW et al., 2001; LABRUNA; PEREIRA, 2001). Outras espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando os cães no Brasil, tais como *Amblyomma ovale*, *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*. No entanto, a ocorrência de diferentes espécies em diversas localidades é resultante das características epidemiológicas particulares de cada região (O'DWYER, 2000).

O'Dwyer (2000) em seu trabalho de diagnóstico de hemoparasitos e carrapatos em cães de área rural em três mesorregiões do RJ encontrou quatro espécies de carrapatos parasitando os cães: *Rhipicephalus sanguineus* (12,4%), *Amblyomma cajennense* (23,6%), *A. aureolatum* (2,8%) e *A. ovale* (2%). No presente trabalho diferentes frequências foram verificadas: do total de 178 cães com carrapatos, a espécie *R. sanguineus* foi encontrada em cães de áreas rurais (60,16%, n=74/123) e urbanas (87,27%, n=48/55); Os carrapatos do gênero *Amblyomma* foram observados em sua maioria em cães domiciliados em áreas rurais do município de Seropédica, tendo somente um cão de área urbana com uma ninfa do gênero. A frequência de cães infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma* em domicílios rurais foi de 47,96% (n=60/123) diferindo significativamente ($p < 0,0001$) das áreas urbanas. *Amblyomma* sp. e *R. sanguineus* foram encontrados simultaneamente em 6,50% (n=8/123) dos cães domiciliados em áreas rurais. Para os demais carrapatos foram encontradas as seguintes frequências para os meios rural e urbano, respectivamente: *Amblyomma cajennense* (11,8%), *Amblyomma ovale* (4,88%), *A. dubitatum*, (0,81%), ninfas de *Amblyomma* sp. (30,89% e 1,82%), ninfas de *R. sanguineus* (8,94% e 23,64%) e larvas Ixodidae (8,13%). Espécimes com apenas uma frequência, refere-se à área rural.

5.6 Diagnóstico de *Babesia canis* pela Técnica de PCR em Tempo Real em Amostras de Carrapatos de Cães de Áreas Rurais e Urbanas do Município de Seropédica, RJ

O diagnóstico de patógenos em vetores é de grande importância para o estudo das doenças transmitidas por carrapatos, bem como os diferentes fatores envolvidos na transmissão aliados ao estudo da mudança de comportamento dos patógenos e vetores em dada região e característica ambiental. Estudos relacionados ao diagnóstico de *Babesia canis vogeli* em carrapatos são em pequeno número.

Foram avaliadas 240 amostras de DNA total extraídas de carrapatos. Quanto à separação das espécies, a PCR foi realizada em 197 amostras de *R. sanguineus* (101 fêmeas, 84 machos e 12 “pools” de cinco ninfas), em 15 amostras de *A. cajennense* (nove fêmeas e seis machos), em oito amostras de *A. ovale* (cinco fêmeas e três machos) e em 20 ninfas de *A. cajennense*.

A frequência de carrapatos positivos para *B. canis* pela Taqman-PCR foi de 5% (n=12/240). O DNA de *B. canis* foi detectado em nove carrapatos adultos de *R. sanguineus* com frequência de 1,67% (n=4/240) em machos e 2,08% (n=5/240) em fêmeas. O DNA também foi detectado em uma fêmea de *A. cajennense* com frequência de 0,42% (n=1/240) e em duas ninfas da espécie, com frequência de 0,83% (n=2/240).

Avaliando-se a positividade para *B. canis*, em relação ao número total de carrapatos de uma mesma espécie observaram-se os seguintes valores: *R. sanguineus* com 4,57% (n=9/197) dos carrapatos positivos, 6,67% (n=1/15) para a espécie *A. cajennense* e ninfas de *A. cajennense* com 10% (n=2/20). Considerando o total de carrapatos positivos para *Babesia* (n=12/240), 75% (9/12) foram *R. sanguineus*, 8,33% (n=1/12) *A. cajennense* e 16,67%

(n=2/12) ninfas desta espécie. Esses dados sugerem que melhores estudos devem ser realizados para verificar a possibilidade da espécie *A. cajennense* estar envolvida na transmissão de *B. canis* na região estudada, visto que tais carrapatos foram provenientes de animais positivos para *Babesia canis vogeli* e, portanto, este resultado pode ter sido influenciado pelo conteúdo sanguíneo do hospedeiro no tudo digestivo do carrapato. Relacionando a positividade dos 12 carrapatos à área de origem, 83,33% (n=10/12) foram obtidos de cães domiciliados em áreas rurais e 16,67% (n=2/12) em área urbana do município de Seropédica. As amostras urbanas positivas foram provenientes de *R. sanguineus*. Estes dados demonstram a alta positividade de *Babesia canis* em carrapatos do meio rural, e portanto, um aumento das frequências de positividade para *B. canis* neste meio em questão.

Comparando-se o diagnóstico positivo para *B. canis* nos carrapatos (n=12) com a positividade do mesmo agente em cães, ambos através da técnica de PCR em tempo real, constatou-se que dos nove carrapatos *R. sanguineus* positivos, apenas um veio de cão positivo para *Babesia canis*. O único exemplar adulto de *A. cajennense* positivo para *B. canis* foi colhido de um cão positivo para o agente, e as duas ninfas positivas de *A. cajennense*, também originaram-se de cães positivos para *Babesia canis*.

M'ghirbi e Bouattour (2008) pesquisaram em áreas rurais da Tunísia, *Babesia* spp. através de Hibridização PCR/RLB para detecção e análise em cães naturalmente infectados e carrapatos recuperado a partir dos cães. Das 180 amostras de sangue coletadas dos cães domésticos em quatro aldeias situadas em diferentes zonas bioclimáticas, 12 (6,7%) foram positivas para *Babesia canis vogeli* e, de um total de 160 exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* analisados, apenas um exemplar (macho) apresentou-se infectado por *B. canis vogeli*. DNA de *Babesia* não foi detectado no sangue do cão que deu origem ao carrapato. Esta baixa frequência de infecção no carrapato foi explicada pela quantidade substancial de inibidores de PCR presentes no DNA extraído dos carrapatos. Este foi o primeiro relato sobre a detecção de DNA de *B. canis vogeli* em cães domésticos e em *R. sanguineus* na Tunísia.

Inokuma et al. (2003) em seus trabalhos de detecção e análise de espécies *Babesia* em carrapatos recuperados a partir de cães do Japão através de diagnóstico pela PCR e análise da sequência de nucleotídeos com base no gene do rRNA 18S, verificaram e relataram pela primeira vez num total de 1.136 carrapatos (*Haemaphysalis flava*, *Rhipicephalus sanguineus*, e *Ixodes ovatus*), DNA de *Babesia canis vogeli* em seis carrapatos (dois *Haemaphysalis* sp., dois *H. longicornis*, um *H. flava* e um *R. sanguineus* e DNA de *Babesia gibsoni* Asia-1 em quatro carrapatos).

O presente estudo verificou positividade nos carrapatos coletados dos cães e ressalta a importância das técnicas moleculares no diagnóstico de patógenos em vetores, corroborando as idéias de René et al. (2012), que em seus estudos na França para obtenção de maiores conhecimentos acerca da prevalência de *Babesia canis vogeli* em cães e carrapatos *R. sanguineus*, realizaram um estudo em clínica veterinária do sul da França, onde doze amostras sanguíneas de cães e 36 carrapatos *R. sanguineus* foram analisados por PCR e posterior seqüenciamento. Quatro cães (33,3%) e oito carrapatos (22,2%) foram encontrados infectados por *B. vogeli*. Esta abordagem revelou pela primeira vez um conjunto de casos de babesiose canina causada por *B. vogeli* na França e destacou a necessidade de fazer de forma sistemática o diagnóstico de patógenos potencialmente responsáveis pela babesiose canina utilizando ferramentas moleculares adequadas.

5.7 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Cães com Diagnóstico Positivo para *B. canis* pela Técnica de PCR em Tempo Real

Os parâmetros hematológicos são indicativos fisiológicos de extrema importância para a avaliação do estado de saúde dos animais. Estes índices são utilizados como uma excelente

ferramenta biológica na rotina clínica, tanto na área médica, como veterinária, auxiliando o diagnóstico de uma gama de enfermidades, dentre estas, as hemoparasitoses (WEISS; WARDROP, 2010). Logo, este tipo de exame pode auxiliar diretamente o médico veterinário na tomada de decisão, quanto a melhor medida de tratamento, para os indivíduos acometidos, assim como na avaliação quanto a gravidade da infecção. Manifestações hematológicas nos casos de babesiose provocada por *B. canis* incluem anemia hemolítica e trombocitopenia, sendo os parasitas raramente vistos no sangue periférico de animais com a infecção subclínica (WEISS; WARDROP, 2010).

No presente estudo, observou-se que os cães infectados (n=37) apresentaram valores médios de número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina inferior em relação aos cães negativos ($P < 0,05$), sendo observado também um quadro de anemia leve, com valores médios abaixo dos valores de referência. Esta anemia nos cães infectados é confirmada ao se observar que a frequência de cães com o número de eritrócitos diminuído, hematócrito baixo e a concentração de hemoglobina diminuída foi maior ($P < 0,05$) nos cães infectados. Estes achados corroboram os estudos de Furlanello et al. (2005), que demonstraram em infecções naturais de *B. canis*, ocorrer anemia, de leve a moderada.

Além disso, pôde se observar que o valor médio do hematócrito foi um pouco abaixo dos índices de referência, no grupo de animais negativos. Este achado, neste grupo de animais pode estar associado a questões de deficiência ou carência nutricional.

Os achados do presente estudo corroboram os resultados de Miranda et al. (2008) que observaram que o tipo de anemia mais frequentemente encontrado na babesiose canina é a do tipo normocítica normocrômica. Contudo, Vasconcelos (2010) observou que 39,5% dos cães com babesiose residentes na região periurbana de Brasília não apresentaram anemia. Da mesma forma, Zygnier et al. (2007) observaram que o quadro de anemia esteve presente em uma minoria de cães diagnosticados com babesiose, o que pode estar intimamente relacionado a subespécie de *Babesia canis* envolvida na infecção (REYERS et al. 1998).

Neste estudo, observou-se uma anemia leve, com valores médios próximos aos limites inferiores, indicando que os animais provavelmente apresentavam-se na fase crônica da doença. Mas, apesar de apresentarem uma anemia leve, a frequência de cães positivos com estas alterações hematológicas foi significativa ($p < 0,05$). Braga (2011) ressalta que animais com estes parâmetros dentro da faixa de normalidade também não devem ter excluída a possibilidade de estarem infectados por *B. canis*.

Em relação ao número de plaquetas, tanto a média dos animais positivos, quanto a frequência de cães neste grupo avaliado (81,1%, n=30/37) apresentaram o mesmo comportamento hematológico de diminuição, sendo estatisticamente diferentes do grupo negativo ($P < 0,05$). Os resultados da presente avaliação corroboram as afirmações referentes à tendência de ocorrência da 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). Alterações na hemostasia podem ser devido a uma resposta de fase aguda e dano endotelial induzido pela hemólise, bem como a interação de eritrócitos parasitados com as células endoteliais (SCHETTERS, 2005).

Apesar da alta frequência de trombocitopenia entre os cães positivos, ao exame físico não foram observados sinais desta alteração, provavelmente por se tratar de uma trombocitopenia moderada. Isto difere dos achados de Gopegui et al. (2007) que verificaram sinais em todos os cães positivos para babesiose. Contudo, vale ressaltar que, a diferença no presente estudo pode estar associada à característica inerente ao tipo de delineamento

experimental, que utilizou animais ao acaso, por conveniência, com a presença marcante de cães assintomáticos para babesiose.

Em relação aos valores médios da série branca, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais positivos e negativos quanto ao número de leucócitos totais, sendo o valor médio inferior nos cães positivos. Contudo, vale destacar que os mesmos valores não estiveram fora da faixa de normalidade de referência para a espécie. Da mesma forma, o valor médio do número de monócitos nos cães positivos foi menor ($P < 0,05$), em relação aos animais negativos, mas mantiveram-se dentro dos limites de referência para a espécie. Apesar da leucopenia ou leucocitose ser descrita em diferentes estágios da babesiose canina (GUELFÍ; CANDEBAT, 1998), não foi evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as frequências de cães positivos com estas alterações, frente aos cães negativos.

Também não houve diferença ($P > 0,05$) entre a frequência de cães com alterações no número de linfócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, monócitos e eosinófilos, entre o grupo de animais positivos e negativos. Estes resultados diferem dos achados de Vasconcelos (2010), o qual observou que 86,04% dos cães infectados com *B. canis* spp., em seu estudo, apresentaram monocitose. É importante destacar que, estas alterações são observadas em cães na fase aguda da doença, com sintomatologia clínica presente. Neste estudo, a maioria dos animais apresentou-se assintomático para babesiose, e desta forma, o grupo de cães positivos provavelmente se encontrava na fase crônica da infecção, não demonstrando tantas alterações na série branca conforme observado na literatura.

Em relação à contagem de eosinófilos, os resultados do presente estudo corroboram os achados de Zygnier et al. (2007), que também não evidenciaram alterações no número de eosinófilos em cães infectados por *Babesia* spp. em relação aos valores de referência para a espécie.

6 CONCLUSÃO

O diagnóstico pela técnica de PCR em tempo real comprovou ser bastante sensível e específico para *B. canis* e a técnica de PCR-RFLP é de grande importância para a discriminação das subespécies deste agente etiológico, nas diferentes regiões de sua ocorrência, demonstrando que devem ser utilizadas em conjunto com outras técnicas diagnósticas em estudos epidemiológicos.

Os resultados do estudo realizado nas áreas rurais e urbanas de Seropédica, RJ, Brasil, permitem concluir que a babesiose canina ocorre com frequência nesta região e atualmente, apenas uma subespécie de *Babesia canis* acomete os cães desta região: *Babesia canis vogeli*.

A falta de conhecimento dos proprietários e/ou aqueles que estão em contato com os cães, sobre a importância dos carrapatos, doenças transmitidas e controle adequado, são importantes fatores que podem propiciar a babesiose canina.

A alta frequência do carrapato *R. sanguineus* nas áreas rurais é resultante da mudança dos hábitos na criação de cães neste meio, que passaram a ter abrigos em alvenaria facilitando o ciclo não parasitário deste vetor, que apresenta hábito nidícola, associada à pequena extensão do município que permite o deslocamento constante dos cães com seus carrapatos vetores e agentes patogênicos entre as áreas rurais e urbanas.

Poucos cães positivos apresentaram sinais clínicos de babesiose, como trombocitopenia, justificando a importância do diagnóstico laboratorial, também como um exame de rotina nos animais e auxílio para diagnóstico diferencial.

Os aspectos epidemiológicos são importantes ferramentas para avaliação soropidemiológica da babesiose canina e tomada de decisões para o manejo profilático dos cães da Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, e as seguintes variáveis que apresentaram associação com a soropositividade para *Babesia canis* podem ser utilizadas para esse meio: área de residência, definição racial, idade, infestação por carrapatos, locais de acesso do cão, contato com outras espécies animais, hábito de vida do cão, ambiente que o animal passa a maior parte do tempo, condição de limpeza do ambiente, falta de assistência veterinária, presença de abrigo, origem do animal e comportamento clínico.

Os resultados do presente estudo sugerem um diferente perfil de parasitismo nas áreas menos urbanizadas, indicando que *Babesia canis vogeli* deve ser considerada como um importante patógeno nestas áreas da Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro e ressalta a importância do desenvolvimento adequado de medidas de controle do vetor e avaliação dos riscos aos quais os animais e humanos estão expostos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, S. U.; MOHAMMED, A. R.; TRIMNEL, A.; SANNUSI, A.; ALAFIATAYO, R. Clinical and hematological findings in seventy naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 145-147, 1990.

ABOGE, G. O.; JIA, H.; KURIKI, K.; ZHOU, J.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, H.; XUAN, X. Molecular characterization of a novel 32-kDa merozoite antigen of *Babesia gibsoni* with a better diagnostic performance by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitology**, v. 134, p. 1185-1194, 2007.

ADACHI, K.; TATEISHI, M.; HORII, Y.; NAGATOMO, H.; SHIMIZU, T.; MAKIMURA, S. Immunologic characteristics of anti-erythrocyte membrane antibody produced in dogs during *Babesia gibsoni* infection. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 57, p. 121-123, 1995.

ADASZEK, L.; WINIARCZYK, S. Application of the SYBR Green real-time HRM PCR technique in the differentiation of the *Babesia canis canis* protozoa isolated in the areas of eastern Poland. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1253–1256, 2010.

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

ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I.; Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, n. 1, p. 11-29, 1983.

ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

ALMEIDA, A. J.; PERNI, C. F. R.; MARIANO, F. A. et al. Ocorrência de *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. associada a parâmetros eritrocitários em caninos domiciliados e não domiciliados em Campos - RJ. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia. 12, 2002. Rio de Janeiro- RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: 2002, (CD).

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 135p.

ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H.; AZAD, A. F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A.; SULZER, A. J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 12, p. 2102-2105, 1980.

ANFALPET – Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: <www.anfalpet.org.br>. Acesso em: 12/03/2012.

ANO, H.; MAKIMURA, S.; HARASAWA, R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 1, p. 111-113, 2001.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia VIII Lista e chave para representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, S. A. **BioEstat 4.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Sociedade Civil/Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2005.

BANSAL, S. R.; GAUTAM, O. P.; BANERJEE, D. P. Prevalence of *Babesia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs of Hissar (Haryana) and Delhi and attempts to isolate *Babesia* from human beings. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, n. 9, p. 748-751, 1985.

BARIĆ RAFAJ, R., MRLJAK, V.; KUČER, N.; BRKLJAČIĆ, M.; MATIJATKO, V. Protein C activity in babesiosis of dogs. **Veterinarski Archiv**, v. 77, n. 1, p. 1-8, 2007.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1º ed. São Paulo: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, v. 14. 2006. 223 p.

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

BÉLANGER, M.; SORENSON, H. L.; FRANCE, M. K.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; ALLEMAN, A. R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.

BELL, C. A.; PATEL, R. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** v. 53, p. 301-306, 2005.

BICALHO, K. A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 546-548, 2002.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; SAVARY, K. C. M.; GAGER, R. B.; BREITSCHWERDT, E. B. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 2, p. 125-128, 1999.

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

BIRKENHEUER, A. J.; CORREA, M.T.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 277, p. 942-947, 2005.

BOBADE, P. A.; ODUYE, O.; AGHOMO, H. O. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* infections in dogs. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 39, n. 2, p. 185-188, 1989.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.

BÖSE, R.; JORGENSSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J. FRIEDHOFF, K. T.; DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.

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

BRAGA, J. F. V. **Babesiose canina em Teresina, Piauí**. 2011. 59f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, PI.

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

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

BREITSCHWERDT, E. B.; MALONE, J. B.; MAC WILLIAMS, P.; LEVY, M. G.; QUALLS, C. W. J. R.; PRUDICH, M. J. Babesiosis in the Greyhound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 182, n. 9, p. 978-982, 1983.

BREITSCHWERDT, E. B. Babesiosis. In: GREENE, R. T. (Ed.). **Enfermedades infecciosas de los perros y gatos**. México: Interamericana, 1993. p. 834-841.

BRUMPT, E. Cycle évolutif de *Piroplasma canis* chez les Ixodidés. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, v. 124, p. 928-931, 1937.

BRUMPT, E. Identification des piroplasmes du chien du type *Piroplasma canis*. Transmission de la souche Française par la tique sud-africaine *Haemaphysalis leachi*. Faible valeur des épreuves d'immunité croisée dans les piroplasmoses. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 16, p. 97-116, 1938.

BUJASSOUM, S.; FONG, I. W.; HANNACH, B.; & KAIN, K. C.; Transfusion transmitted babesiosis in Ontário: first reported case in Canada; **Canada Communicable Disease Report**, v. 26, p. 9-13, 2000.

CACCIÒ, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 285-292, 2002.

CAMACHO, A. T.; PALLAS, E.; GESTAL, J. J.; GUITIAN, F. J.; OLMEDA, A. S.; GOETHERT, H. K.; TELFORD, S. R. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Veterinary Record**, v. 149, n. 18, p. 552-555, 2001.

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.

CAPRARIIS, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G.; MENCKE, N.; STANNECK, D.; BREITSCHWERDT, E. B.; OTRANTO, D. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1-2, p. 206-212, 2010.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sobre a moléstia dos cães, chamada Nambi-Uvú e o seu parasita *Rangelia vitalii*. **Anuario Paulista de Medicina e Cirurgia**, v. 3, n. 3, p. 65-71, 1914.

CARINI, A. Sobre o ciclo de desenvolvimento exoeritrocítico de um piroplasma de cão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 32, n. 285, p. 49-52, 1948.

CARLI, E.; TASCA, S.; TROTTA, M.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 51-57, 2009.

CARRET, C.; WALAS, F.; CAREY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotes Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CARVALHO, D. F.; SILVA, L. D. B.; FOLEGATTI, M. V.; COSTA-JUNIOR, L. M.; CRUZ, F. A. Avaliação da evapotranspiração de referência na região de Seropédica-RJ, utilizando lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 14, n. 2, p. 108-116, 2006.

CASAPULLA, R.; BALDI, L.; AVALLONE, V.; SANNINO, R.; PAZZANESE, L.; MIZZONI, V. Canine piroplasmosis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. **Veterinary Record**, v. 142, n. 7, p. 168-169, 1998.

CHANG, W. L.; PAN, M. J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3142-3146, 1996.

CHANG, W. L.; SU, W. L.; PAN, M. J. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 9, p.849-851, 1997.

CHAUVIN, A.; OREAU, E. M.; BONNET, S. B.; PLANTARD O, MALANDRIN L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, p. 37, 2009.

CITARD, T.; MAHL, P.; BOULOUIS, H. J.; CHAVIGNY, C.; DRUILHE, P. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. **Tropical Medical Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 172-179, 1995.

CLARK, I. A.; JACOBSON, L. S.; Do babesiosis and malaria share a common disease process? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, p. 481-483, 1998.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Editora Manole. 1984. 565 p.

COLLETT, M. G. Survey of canine babesiosis in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n. 3, p. 180-186, 2000.

CONRAD, P. A.; THOMFORD, J. W.; YAMANE, I.; WHITING, J.; BOSMA, L.; UNO, T.; HOLSHUH, H. J.; SHELLY, S. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 5, p. 601-605, 1991.

COSTA-JUNIOR, L. M. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular**. 2007. 94f. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; RIBEIRO, M.F.B.; REMBECK, K.; RABELO, E.M.L.; ZÄHLER-RINDER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas 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.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; ZÄHLER-RINDER, M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, 03/2012; DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.015. *in press*.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

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

DANTAS-TORRES, F. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, p. 210-211, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; MARCELA, F.; FIGUEREDO, L. A. E.; BRANDAO-FILHO, S. P. Infestação por ectoparasitos em cães rurais no município de São Vicente Férrer, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 75-77, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites and Vectors**, v. 3, p. 3-14, 2010.

DASEY, M. J.; MARTINEZ, H.; RAIMONDO, T.; BROWN, C.; BRADY, J. Septic shock due to babesiosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 37-38, 2001.

DAWSON, J. E.; BIGGIE, K. L.; WARNER, C. K.; COOKSON, K.; JENKENS, S.; LEVINE, J. F. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 8, p. 1175-1179, 1996.

DELL'PORTO, A. **Estudo da ocorrência de *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São Paulo**. 1986. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva do Instituto de Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo, São Paulo.

DELL' PORTO, A.; OLIVEIRA, M. R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo: Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.

DUARTE, S. C.; LOULY, C. C. B.; SILVEIRA NETO, O. J.; ROMANOWSKI, T. N. A.; LINO JUNIOR, R. S.; LINHARES, G. F. C. Diagnóstico parasitológico e molecular da babesiose canina na cidade de Goiânia-GO. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-236, 2008.

DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EDDLESTONE, S. M.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R.; GILL, A.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 840-844, 2006.

EIRAS, D. F.; BASABE, J.; MESPLET, M.; SCHNITTGER, L. First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 294-298, 2008.

FENNER, W. R. **Manual de Prática Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 413 p.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

FÖLDVÁRI, G.; HELL, E.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 221-226, 2005.

FÖLDVÁRI, G.; MÁRIALIGETI, M.; SOLYMOSI, N.; LUKÁCS, Z.; MAJOROS, G.; KÓSA, J. P.; FARKAS, R. Hard Ticks Infesting Dogs in Hungary and their Infection with *Babesia* and *Borrelia* Species. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p. 25-34, 2007.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K. R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. In *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 134, p. 1-7, 2005.

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

FREIRE, J. J. Revisão das espécies da família Ixodidae. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 8, p. 1-16, 1972.

FRIEDMAN, A. D.; VINOD, K.; FRIEDMAN, D. (2004). Babesiosis. Disponível em: <<http://www.emedicine.medscape.com>> Acesso em: 16/04/11.

FRITZ, D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March. 2008). **Parasitology Research**, v. 106, p. 1339-1342, 2010.

FUKUMOTO, S.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SHIGENO, S.; KIMBITA, E.; IGARASHI, L.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; XUAN, X. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 977-981, 2001.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGU, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 77-85, 2005.

FURUTA, P. R. **Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis***. 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

GARCÍA-SANMARTÍN, J.; BARANDIKA, J. F.; JUSTE, R. A.; GARCÍA-PÉREZ, L. A.; HURTADO, A. Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 318–325, 2008.

GAZETA, G. S.; CARVALHO, R. W.; AVELAR R. F.; AMORIM M.; ABOUD-DUTRA A. E. Ocorrência de *Babesia* sp em pequenos roedores no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 741-744, 2004.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**. v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GONDIM, L. F. P.; KONAYAGAWA, A.; ALENCAR, N. X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA R. F.; FRANCO, S. R. V. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 319-323, 1998.

GONZÁLEZ, A.; CASTRO, D. C.; GONZÁLEZ, S. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 123-129, 2004.

GOO, Y.; HONGLIN, J.; ABOGE, G. O.; TERKAWI, M. A.; KURIKI, K.; NAKAMURA, C.; KUMAGAI, A.; ZHOU, J.; LEE, E.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 555-560, 2008.

GOPEGUI, R. R.; PEÑALBA, B.; GOICOA, A.; ESPADA, Y.; FIDALGO, L. E.; ESPINO, L. Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. **The veterinary Journal**, v. 174, p. 129-132, 2007.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L. *Babesia gibsoni*: field and laboratory studies of canine infections. **Experimental Parasitology**, v. 31, p. 153-159, 1972.

GUELFY, J. F., CANDEBAT, D. Variations de l' hémogramme en fonction de l' ancienneté des symptomes chez les chiens adultes atteints de babésiose äigue spontanée. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 149, p. 65-68, 1998.

GUGLIELMONE, A. A.; LUGARESI, C. I.; VOLPOGNI, M. M.; ANZIANI, O. S.; VANZINI, V. R. Babesial antibody dynamics after cattle immunization with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 1-3, p. 33-39, 1997.

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

GUIMARAES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. S. F.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 2009.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, B. S.; ROCHA, C. M. B. M. Ectofauna parasitária de cães urbanos domiciliados atendidos em clínicas veterinárias particulares na cidade de Lavras, MG. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 172-177, 2011.

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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 229, 2004.

GÜLANBER, A.; GORENFLOT, A.; SCHETTERS, T. P. M.; CARCY, B. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 224-230, 2006.

HARRISON, B. A.; ENGBER, B. R.; APPERSON, C. S. Ticks (Acari: Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. **Journal of Vector and Ecology**, v. 22, p. 6-12, 1997.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

HARTELT, K.; OEHME, R.; FRANK, H.; BROCKMANN, S. O.; HASSLER, D.; KIMMIG, P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 37, p. 86-92, 2004.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HARVEY, J. W.; TABOADA, J.; LEWIS, C. Babesiosis in a litter of pups. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1751-1752, 1988.

HAUSCHILD, S.; SHAYAN, P.; SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitology Research**, v. 81, n. 8, p. 638-642, 1995.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 451-469, 2000.

HUMICZEWSKA, M.; KUZNA-GRYIEL, W. A case of imported human babesiosis in Poland. **Wiad Parazytol**, v. 43, p. 227-229, 1997.

HUNFELD K., HILDEBRANDT A., GRAY J., Babesiosis: Recent insights into an ancient disease, **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1219-1237, 2008.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, T. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

IBGE: Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/censo2010/>>. Acesso em: 01 mar. 2012.

IBOPE. Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística. Disponível em: <www.ibope.com.br>. Acesso em: 10/02/2009.

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3031-3039, 2001.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; OKUDA, M.; ONISHI, T. Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3494-3498, 2003.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 341-346, 2004.

IONITA, M.; MITREA, I. L., PFISTER, K.; HAMEL, D.; BUZATU, C. M.; SILAGHI, C. Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p.1659-1664, 2012.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

IRWIN, P. J. Review. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites and Vectors**, v. 1, p. 1-9, 2009.

JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 126-139, 2006.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; MUHLNICKEL, C. J.; IRWIN, P. J. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 409-412, 2003.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. PCR-RFLP for detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 20-27, 2007.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R. S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KATSANDE, T. C.; MORE, S. J.; BOCK, R. E.; MABIKACHECHE, L.; MOLLOY, J. B.; NCUBE, C. A serological survey of bovine babesiosis in Northern and Eastern Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 255-263, 1999.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: Bioquímica clínica e hematologia**, São Paulo: Roca, 2ed. 2003. 436 p.

KJEMTRUP, A. M.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A. J.; CUMMINGS, J.; BOUDREAUX, M. K.; STOCKHAM, S. L.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; CONRAD, P. A. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 14, p. 1501-1505, 2000a.

KJEMTRUP, A. M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T.; CONRAD, P. A. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. **Parasitology**, v. 120, n. 5, p. 487-493, 2000b.

KJEMTRUP, A. M.; CONRAD, P. A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 112-117, 2006.

KJEMTRUP, A. M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B. L.; CARRENO, R. A. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 103-111, 2006.

KLEDMANEE, K.; SUWANPAKDEE, S.; KRAJANGWONG, S.; CHATSIRIWECH, J.; SUKSAI, P.; SUWANNACHAT, O.; SARIYA, L.; BUDDHIRONGAWATR, R.; CHAROONRUT, P.; CHAICHOUN, K. Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in Canine Blood. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, n. 1, p. 35-39, 2009.

KOCH, R. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. Zeitschrift für Infektionskrankheiten. **Parasitäre Krankheiten Hygiene Haustiere**, v. 54, p. 1-9, 1906.

KRAUSE, P. J.; TELFORD III, S.; SPIELMAN, A.; RYAN, R.; MAGERA, J.; RAJAN, T. V.; CHRISTIANSON, D.; ALBERGHINI, T. V.; BOW, L.; PERSING, D. Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2791-2794, 1996.

KUBELOVÁ, M.; TKADLEC E.; BEDNÁR, M.; ROUBALOVÁ, E.; SIROKY, P. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 191-196, 2011.

KUTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. In: Ristic, M. (Ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. CRC Press, Boca Raton, 1988. p. 1-22.

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon-Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, p. 774-776, 2000.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARAES Jr., J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

LAPPIN, M. R. Doenças infecciosas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006. 1360p.

LEATCH, G. B. V. Parasitas sanguíneos. In: **Manual Merck de veterinária**. 8ed. São Paulo: Editora Roca, 2001. p. 20-23.

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.

LEMONS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SERRA FREIRE, N. M.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S. Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 181-185, 1997.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of American Microscopical Society**, v. 90, p. 2-33, 1971.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, III. J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Iowa State University Press, Ames, IA. 1985.

LEVINE, N. D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. CRC Press, Florida: Boca Raton, 1988. V. II, p. 35-41.

LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. **American Journal of Veterinary Medicine Association**, v. 48, n. 3, p. 339-341, 1987.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; DE WAAL, D. T. Isolation of south African vector-specific strain of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 1-2, p. 9-16, 1996.

LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 33, p. 529-538, 1973.

LISBÔA, R. S. **Diagnóstico dos Gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em Cães Domésticos e Caracterização de *Anaplasma platys* na Região Metropolitana do Rio de Janeiro**. 2010. 111f. Tese (Doutorado) (Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 4, p. 418-431, 1998.

LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 63-68, 2002.

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

M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 1-7, 2008.

MACINTIRE, D. K.; BOUDREAUX, M. K.; WEST, G. D. C.; BOURNE, C.; WRIGHT, J. C.; CONRAD, P. A. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 325-329, 2002.

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

MAHONEY, D. F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v. 4, p. 1-76.

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

MAIA, M. G.; COSTA, R. T.; HADDAD, J. P. A. PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 79, n. 2-4, p. 155-162, 2007.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 01/03/2012.

MARCONDES, C. B. Generalidades e Importância das Doenças Relacionadas com Artrópodes. In: MARCONDES, C. B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. 2009. p. 1-3.

MAROLI, M.; KHOURY, C.; FRUSTERI, L.; MANILLA, G. Diffusione della zecca del cane (*Rhipicephalus sanguineus* LATREILLE, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 32, n. 3, p. 387-397, 1996.

MARTIN, A. R.; BROWN, G. K.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 3, p. 176-80, 2005.

MARTINOD, S.; BROSSARD, M.; MOREAU, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. **Journal of Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 269-273, 1985.

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 3-4, p. 245-54, 1986.

MARTINS, T. F. **Descrição e redescrição morfológica do estágio ninfal e chave taxonômica para ninfas de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) que ocorrem no Brasil**. 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARUYAMA, S.; MASSARD, C. A. *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MASSARD, C. A., MASSARD, C. L., REZENDE, H. E. B. Carrapatos de cães em áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 1981, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: SBP, 1981. p. 201.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MASSARD, C. L.; SILVA, B. C. D.; BEZERRA, V. I.; LOPES, C. W. G. Estudo retrospectivo da babesiose em cães domiciliados na zona oeste do município do Rio de Janeiro, RJ. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, e II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2006. Ribeirão Preto, SP. **Anais...**Ribeirão Preto, 2006. p. 355.

MASUDA, T.; BABA, E.; ARAKAWA, A. Relapse of canine babesiosis after prednisolone treatment. **Modern Veterinary Practice**, v. 64, p. 931-932, 1983.

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

MATJILA, P. T.; PENZHORN, B. L.; BEKKER, C. P. J.; NIJHOF, A. M.; JONGEJAN, F. Confirmation of occurrence *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 119-125, 2004.

MATSUI, T.; INOUE, R.; KAJIMOTO, K.; TAMEKANE, A.; OKAMURA, A.; KATAYAMA, Y.; SHIMOYAMA, M.; CHIHARA, K.; SAITO-ITO, A.; TSUJI, M. First documentation of transfusion-associated babesiosis in Japão. **Rensho Ketsueki**, v. 41, p. 628-634, 2000.

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

MATSUU, A.; ONO, S.; IKADAI, H.; UCHIDE, T.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OKANO, S.; HIGUCHI, S. Development of a SYBR Green real-time PCR assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n. 2, p. 569-573, 2005.

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

McQUISTION, J. M.; CHILDS, J. E.; CHAMBERLAND, M. E.; TABOR, E.; Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known potential risks in the United States. **Transfusion**, v. 40, p. 274-284, 2000.

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

MERLE, C.; SOTTO, A.; BARBUAT, C.; JOURDAN, J. Disease course of Mediterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. **7e Colloque sur le Controle Epidemiologique des Maladies Infectieuses**, v. 21, p. 400-401, 1998.

MIRANDA, F. J. B.; ALBERNAZ, A. P.; MELO JR, O. A.; MACHADO, J. A. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 238-241, 2008.

MOREIRA, J. Sobre a natureza do Nambiuvú dos cães. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 9, p. 315-319, 1938.

MOTTIN, V. D.; SILVA, C. C.; CHIMINAZZO, C.; CERESER, V. H.; QUEIROLO, M. T.; FISCHER, C. D. B. Ocorrência de *Babesia canis*, Piana & Galli-Valerio, 1895, em esfregaços sangüíneos periféricos de cães no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: EXPOGRAMADO, 2008.

MOURA, S. T.; FERNÁNDEZ, C. G. N.; RUFFINO, S. M.; GROSZ, L. C. B.; SERRA-FREIRE, N. M. Ocorrência de hemoparasitos em cães de Cuiabá, Estado de Mato Grosso 2002. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 12, 2002. Rio de Janeiro-RJ. **Anais...**Rio de Janeiro: 2002, (CD).

MUNDIM, E. C. S.; FRANCISCO, M. M. S.; SOUZA, J. N.; ALENCAR, M. A. G.; ; RAMALHO, P. C. D.; Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiares*) de rua capturados pelo centro de controle de zoonoses (ccz) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência**, v. 12, n. 2, p. 107-115, 2008.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

NALUBAMBA, K. S.; HANKANGA, C.; MUDENDA, N. B.; MASUKU, M. The epidemiology of canine *Babesia* infections in Zambia. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 99, n. 2-4, p.240-244, 2011.

NARANTSATSRAL, S.; GOO,Y.; BATTSETSEG, B.; MYAGMARSUREN, P.; TERKAWI, M. A.; SOMA, T.; LUO, Y.; LI, Y.; CAO, S.; YU, L.; KAMYINGKIRD, K. ABOGE, G. O.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Expression of truncated *Babesia gibsoni* thrombospondin-related adhesive proteins in *Escherichia coli* and evaluation of their diagnostic potential by enzyme-linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 196-202, 2011.

NAZARENKO, I.; BHATNAGAR, S.; HOHMAN, R. A. closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 12, p. 2516-2521, 1997.

NEITZ, W. O.; STEYN, M. P. The transmission of *Babesia canis* (PIANA and GALLI-VALÉRIO, 1895) to the black backed jackal (*Thos mesonelas mesonelas* Schreber). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 1947.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças protozoárias polissistêmicas. **Medicina interna de pequenos animais**. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. p.1035-1036.

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

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

O'DWYER, L. H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C. L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, p. 83-84, 1997.

O'DWYER, L. H. O. **Diagnóstico de hemoparasitas e carrapatos de cães provenientes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2000. 97f. Tese (Curso de Pós-graduação em Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

O' DWYER, L. H, MASSARD, C. L, PEREIRA DE SOUZA, J. C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: Almosny, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002. p. 57-67.

O'DWYER, L. H.; LOPES, V. V.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 23-26, 2009.

OHNISHI, T.; UEDA, K.; HORIE, M. KAJIKAWA, T.; OHISHI, I. Serum hemolytic activity in dogs with *Babesia gibsoni*. **Journal of Parasitology**, v.76, p.564–567, 1990.

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

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. R.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine ecto-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 157-163, 2009.
- OTSUKA, H. Studies on transmission of *Babesia Gibsoni*, Patton by *Haemaphysalis longicornis* Neumann. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, University of Miyazaki**, v. 21, p. 359-367, 1974.
- OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1343-1346, 2005.
- PAGE, R. L. Hematologia/Oncologia. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Rocca, p.165-245, 1998.
- PASSOS, L. M.; BELL-SAKYI, L.; BROWN, C. G. Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 239-249, 1998.
- PASSOS, L. M.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.
- PATTON, W. S. Rapport préliminaire sur un nouveau piroplame, *P. gibsoni nov. sp.* Trouvé dans le sang du chien de madras et du chacal *Canis aureus*. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 3, p. 274-280, 1910.
- PERSING, D. H.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, W. F.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.; THOMFORD, J. W.; CONRAD, P. A. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reacton. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2097-2103, 1992.
- PESTANA, B. R. O nambyuvú. **Revista Médica de São Paulo**, v. 22, p. 423-426, 1910.
- PIEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.
- PINYOOWONG, D.; JITTAPALAPONG, S.; SUKSAWAT, F.; STICH, R. W.; THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 433-438, 2008.
- RAR, V. A.; FOMENKO, N. V.; DOBROTVORSKY, A. K.; LIVANOVA, N. N.; RUDAKOVA, S. A.; FEDOROV, E. G.; ASTANIN, V. B.; MOROZOVA, O. V. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1708-1715, 2005a.

RAR, V. A.; MAKSIMOVA, T. G.; ZAKHARENKO, L. P.; BOLYKHINA, S. A.; DOBROTVORSKY, A. K.; MOROZOVA, O.V. *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 5, p. 285-287, 2005b.

REGENDANZ, P.; MUNIZ, J. O. *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 1, p. 81-84, 1936.

REICHENOW, E. Uebertragungsweise and entwicklung der piroplasmen. **Zentralblatt für Bakteriologie 1 Abt Originale B, Hygiene, Krankenhaushygiene, Betriebshygiene, präventive Medizin**, v.135, p.108-119, 1935.

REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 19, n. 2, p. 68-74, 2004.

REITER, I.; WEILAND, G. Recently developed methods for the detection of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 21-23, 1989.

RENÉ, M.; CHÊNE, J.; BEAUFILS, J. P.; VALIENTE MORO, C.; BOURDOISEAU, G.; MAVINGUI, P.; CHABANNE, L. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 399-407, 2012.

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? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, p. 503-511, 1998.

REZENDE, H. E. R. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910), hemoparasito dos cães no estado do Rio de Janeiro. In: **XV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Rio de Janeiro, 1976.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 6, p. 511-517, 1990.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffensis*, *E. canis* or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, 1994.

RIOS, L.; ALVAREZ, G.; BLAIR, S. Estudo sorológico e parasitológico e relato do primeiro caso de babesiose humana na Colômbia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 493-498, 2003.

- RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC Press Inc., 1988, 255p.
- RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.
- ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 155-158, 2002.
- RUAS, J. L.; MASTRANTONIO, B.; FARIAS, N. A. R. Infecção por *Babesia spp.* em canídeo silvestre no sul do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 12, 2002, Rio de Janeiro-RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: 2002, (CD).
- S , A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H.; MACIEIRA, D. B.; ABREU, F. S.; FERREIRA, R. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* form naturally infected Brazilian dogs. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 163-168, 2006.
- SAHIBI, H.; RHALEM, A.; BERRAG, B.; GOFF, W. L. Bovine babesiosis. Seroprevalence and ticks associated with cattle from two different regions of Morocco. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 213-218, 1998.
- SAITO-ITO, A.; TSUJI, M.; WEI, Q.; HE, S.; MATSUI, T.; KOHSAKI, M.; ARAI, S.; KAMIYAMA, T.; HIOKI, K.; ISHIHARA, C. Transfusion acquired, autochthonous human babesiosis in Jap o: isolation of *babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4511-4516, 2000.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada   experimenta o animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SANTOS, A. G. **Perfil epidemiológico da popula o canina assistida pelo serviço de pronto atendimento do CCZ Paulo Dacorso Filho, RJ – Brasil**. 2006. 64 f. Disserta o (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, ROBERTA B.R. BENEDETTI, 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.
- SCHAARSCHMIDT, D.; TRACHSEL M.; ACHERMANN, M.; HARTELT, K.; OEHME, R.; MULLER, W. Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 148, p. 633-640, 2006.
- SCHETTERS, T. H. P. M.; MOUBRI, K.; PRECIGOUT, E.; KLEUSKENS, J.; SCHOLTES, N. C.; GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997.

SCHETTERS, T. H. P. M.; KLEUSKENS, J. A. G. M.; SCHOLTES, N. C. PASMEN, J. W. Parasite localization and dissemination in the *Babesia*-infected host. **Annual Tropical Medicine Parasitology**, v.92, p.513–519, 1998.

SCHETTERS, T. H. P. M. Vaccination against canine babesiosis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 179-84, 2005.

SCHETTERS, T. H. P. M.; KLEUSKENS, J.; VAN DE CROMMERT, V.; DE LEEUW, P. W.; FINIZIO, A. L.; GORENFLOT, A. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 7-15, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A.; MILLS, A. G.; GORN, V.; SINGER, M. J.; REED, M. W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194-204, 2000.

SCHOOLS, L. M.; VAN DE POL, I.; RIJKEMA, S. G. T.; SCHOT, C. S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2215-2222, 1999.

SHAKESPEARE, A. S. The incidence of canine babesiosis amongst sick dogs presented to the Onderstepoort Veterinary Academy. **Journal of South of African Veterinary Association**, v. 66, n. 4, p. 247-250, 1995.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

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

SHORTT, H. E. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 2, p. 119-148, 1973.

SILVA, I. P. C. **Estudo de Hemoparasitas transmitidos por vectores em cães de canil**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.

SILVEIRA, J. A. G.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 270-275, 2009.

SIRIGIREDDY, K. R.; MOCK, D. C.; GANTA, R. R. Multiplex Detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* Pathogens in Vertebrate and Tick Hosts by Real-Time RT-PCR. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 552-556, 2006.

SKOTARCZAK, B.; CICHOCKA, A. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. **Annals of Agriculture and Environment Medicine**, v. 8, p. 187-189. 2001.

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

SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. E. S. E.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 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, n. 3-4, p. 211-221, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 48-60, 2011.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias**. 7 ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana, 1987. 823p.

SPIEWAK, G. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por *Babesia canis*, em cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte**. 1992. 67f. Dissertação (Escola de Veterinária da UFMG). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infection in dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1031-1035, 2005.

SWAMINATH, C. The arthropod vector of *Babesia gibsoni*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 25, p. 499-503, 1937.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 10-11, p. 909-916, 2001.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Tick Transmitted Diseases**, v. 21, n. 1, p. 103-123, 1991.

TABOADA, J.; HARVEY, J. W.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of babesiosis in Grey-hounds in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 1, p. 47-50, 1992.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. **Infecções por protozoários e por outras causas**. In: Ettinger, S. J; Feldman, E. C. (Ed.). Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Manole, 1997. p. 563-565.

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

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3ed. Elsevier Inc. 2006. p.722-736.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S. M.; FOLEY, J. Ticks and tickborne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 119-127, 2005.

TODOROVIC, R. A. Serological diagnosis of babesiosis: A review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 7, p. 1-14, 1975.

TORRES, H. M.; MASSARD, C. L.; FIGUEIREDO, M. J.; ALMOSNY, N. R. P.; FERREIRA, T. Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 77-82, 2002.

TRÄCHSEL, M.; 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. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006b.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 177-180, 2006.

TROTTA, M.; CARLI, E.; NOVARI, G.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGU, L. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. **Veterinary Parasitology**, v.165, p. 318-322, 2009.

TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-308, 1996.

UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F. J.; PERIÉ, N. M.; SPANJER, A. A. M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, v. 11, n. 1, p. 33-40, 1989.

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 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. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 178-183, 2007.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 306p.

VALLI, V. E. O. **Hematopoietic system**. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. v. 1-3, 5 ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2007. p. 107-324.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; FARIA, J. L. M.; MUNHOZ, T. D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, M.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI COSTA, M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 254-260, 2012.

VASCONCELOS, M. F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília, Brasília, DF.

VERCAMMEN, F.; DEKEN, R.; MAES, L. Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. **Parasite**, v. 2, n. 4, p. 407-410, 1995.

VERCAMMEN, F., DE DEKEN, R.; MAES, L. Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3-4, p. 251-255, 1996.

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

VERDIDA, R. A.; 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, n. 1, p. 58-61, 2004.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WEISS, D.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. (6th ed.). Ames (IA): Blackwell Publishing. 2010, 1232 p.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WENYON, C. M. Protozoology. In: **A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists**, v. II, New York: Hafner Publish. Co., 1926. p. 986.

WHITE, D. J.; TALARICO, J.; CHAANG, N. M.; BIRKHEAD, G. S.; HEIMBERGER, T.; MORSE, D. L.; Human babesiosis in New York State: review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. **Archive International of Medicine**, v. 158, p. 2149-2154; 1998.

WILHELM, J.; PINGOUD, A.; HAHN, M. Comparison between Taq DNA polymerase and its Stoffel fragment for quantitative real-time PCR with hybridization probes. **Biotechniques**, v. 30, n. 5, p. 1052-1062, 2001.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 75-98, 1991.

YAMANE, I.; THOMFORD, J. W.; GARDNER, I. A.; DUBEY, J. P.; LEVY, M.; CONRAD, P. A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1579-1584, 1993.

YAMANE, I.; GARDNER, I. A.; RYAN, C. P.; LEVY, M.; URRICO, J.; CONRAD, P. A. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 18, n. 4, p. 293-304, 1994.

YIN, J. L.; SHACKEL, N. A.; ZEKRY, A.; MCGUINNESS, P. H.; RICHARDS, C.; PUTTEN, K. V. D.; MCCAUGHAN, G. W.; ERIS, J. M.; BISHOP, G. A. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. **Immunology and Cellular Biology**, v. 79, n. 3, p. 213-221, 2001.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of Antibodies to Tick-borne Agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in Patients from Cotia County, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p. 544-548, 1998.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, 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). **Poland Journal of Veterinary Science**, v. 10, p. 245-253, 2007.

ZYGNER, W.; JAROS, S.; WEDRYCHOWICZ, H. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (Central Poland). **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 139-142, 2008.

ZYGNER, W.; BASKA, P.; WIŚNIEWSKI, M.; WEDRYCHOWICZ, H. The molecular evidence of *Babesia microti* in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 95-97, 2010.

ANEXOS

ANEXO A. Questionário epidemiológico e termo de livre esclarecimento aplicados aos proprietários de cães domiciliados no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

ANEXO B. Protocolo de ELISA para a detecção de anticorpos IgG ANTI-*Babesia canis*.

ANEXO C. Protocolo de extração de DNA das amostras sanguíneas de cães com auxílio do kit de extração de DNA.

ANEXO D. Protocolo de extração de DNA de Carrapato.

ANEXO E. Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ / COMEP

ANEXO A. Questionário epidemiológico e termo de livre esclarecimento aplicados aos proprietários de cães domiciliados no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ___/___/___ Propriedade N° _____ Zona: () Rural () Urbana

Localidade: _____ Coord. Geográf.: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Pt de referência: _____ Temperatura ambiente: _____

Tel: _____ e-mail: _____

Tipo de residência: () pau a pique () alvenaria () madeira () outros: _____

Há parasitismo por carrapatos em pessoas: () sim () não () já ocorreu

Tipo de vegetação predominante: _____

Quantos cães na propriedade? _____

Pratica alguma ação para controle de carrapato? sim () não () Qual? _____

Leva o cão ao veterinário? sim () não () Qual a periodicidade? _____

Presença de outras espécies domésticas:

() gatos () bovinos () equinos () outros: Quais?.....

Presença de animais silvestres:

() gambá () roedores () outros: _____ Quais? _____

Proprietário informado sobre os riscos das doenças Transmitidas por Carrapatos?

O proprietário conhece alguma doença transmitida por carrapatos? Qual? _____

() Nunca ouviu falar () Já ouviu falar () Sabe da relação com o cão () Sabe da relação com o carrapato

Conhece algum sintoma () sim () não. Se sim, qual? _____

Proprietário informado sobre os riscos dos carrapatos? () sim () não

Conhece o nome do vetor () Conhece a forma de transmissão ()

Conhece algum caso na localidade de “doença do carrapato” em humanos?

() sim () não

Condição econômica (observacional): () baixa () média () alta

Escolaridade:

() Nunca frequentou a escola

() 1° grau incompleto

- 1º grau completo
 2º grau incompleto
 2º grau completo
 superior

Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____

Utiliza produtos inseticidas no ambiente? sim não

Quais? _____ Intervalos? _____

Utiliza métodos Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

sim não Quais? _____ Intervalos? _____

Outras obs relevantes: _____

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL Nº _____

Data: __/__/__ Propriedade Nº __ Zona: Rur Urb Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: Macho Fêmea

Raça: _____ Cor: _____

Animal nascido na propriedade? sim não

Se não, de onde veio o animal? _____

Há qt tempo está com o animal? _____ Histórico de carrapatos antes: sim não

Histórico de carrapatos na vizinhança: sim não

Pêlo: curto médio longo Porte: peq méd grande

Escore: caquético magro normal obeso

Comportamento: triste ativo/normal agitado

Idade: <6 meses 6 meses a 2 anos 2 a 5 anos 5 a 10 anos > 10 anos

Temperatura: _____ Pulso: _____ FR: _____ FC: _____ TPC: _____ turgor: _____

Mucosa ocular: hipocorada normocorada ictérica congesta

Mucosa oral: hipocorada normocorada ictérica congesta

Outras alterações sanitárias atuais: _____

Distúrbios atuais de coagulação na pele: petéquias equimoses outros: Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: sim não

Animal vive dentro da residência: sim não às vezes

Acesso do animal: pastagens córregos matas ambiente urbano

Contato direto com outras sp animais: sim não Quais? _____

Histórico de patologias anteriores: _____

Animal teve “doença do carrapato”? () sim () não qual? _____

Como diagnosticou? () clinicamente () laboratorialmente () outras

Foi tratado? () sim () não

Tipo de alimentação: () comida () ração () ambos

Possui água e comida à disposição o tempo todo? () sim () não

Vermifugação: () sim () não Há qto tempo? _____ Qual produto? _____

Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Possui ectoparasitos? () sim () não

Quais e quantidade?

() pulgas _____

() piolhos _____

() sarnas _____

() carrapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

Se não trata, qual motivo? _____

Critério para escolha do produto:

() indicação () balconista () veterinário () propaganda

Dermatopatias? () sim () não Sinais de otite? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

Hábito do animal?

() sempre preso

() preso de dia e solto à noite

() solto

Apresenta abrigo? () sim () não Tipo: _____

Tipo de ambiente do animal:

() cimentado

() de terra

() gramado

() outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: () ruim () moderada () satisfatória

Frequência de recolhimento e limpeza das fezes:

() diariamente () 2 a 3 x por sem () 1 x por semana () não faz

Tem assist Vet? () sim () não

Frequência? () a cada 6 meses () 1 x por ano () só qd fica doente

Animal é vacinado? () sim () não Quais vacinas? _____

Banho: () semanal () quinzenal () mensal () outros

Usa produtos parasiticidas? () sim () não Quais? _____

Outras obs relevantes: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____

_____ endereço: _____

_____, telefone: _____ recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___/___/___ Assinatura:

ANEXO B. Protocolo de ELISA para a detecção de anticorpos IgG ANTI-*Babesia canis*.

1. Sensibilizar a placa (Polysorp®, Nunc Ltda) com o antígeno na concentração de **5 µg/mL**, diluindo-o em tampão PBS pH 7,2. Colocar 100 µL/well, exceto no branco da placa;
2. Incubar “overnight” em câmara úmida (4°C – geladeira);
3. Lavar 3x com PBS Tween 20 (NÃO ECONOMIZAR!!!). Secar bem a placa;
4. Bloquear com PBS Tween 20 + 5% leite em pó (Molico), colocando **200 µL/well**;
5. Incubar em câmara úmida, a 37°C, durante 2 horas;
6. Lavar 3x com PBS Tween 20;
7. Diluir os soros em PBS Tween 20 + 5% de leite em pó desnatado (Molico®), na diluição de **1:50**. Colocar 100 /well;
8. Incubar em câmara úmida à 37°C, durante 1h30min;
9. Lavar 3x com PBS Tween 20. Secar bem a placa;
10. Adicionar o conjugado anti-cão diluído em PBS Tween 20 + 5% leite em pó desnatado (Molico®), colocando **100 µL/well**;

Conjugado utilizado: Sigma anti-dog IgG Alkaline Phosphatase Conjugate – diluição 1:2000

11. Incubar em câmara úmida, a 37°C, durante 1 h 30 min horas

12. Lavar 3x com PBS Tween 20

13. Adicionar o substrato para fosfatase alcalina, o P-nitrofenilfosfato, colocando **100 µL/well**. Diluir 2 comprimidos do substrato (5 mg cada comprimido) em 10 mL de Tampão dietanolamina. Usar frasco escuro ou enrolar em papel alumínio.

Cuidado ao usar a multicanal, pois poderá faltar substrato para os últimos pocinhos;

14. Fazer a leitura da placa em filtro de 405 nm, após incubação à temperatura ambiente durante 55 minutos.

ANEXO C. Protocolo de extração de DNA das amostras sanguíneas de cães com auxílio do kit de extração de DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega).

Bateria com 12 amostras demora cerca de 3 horas.

Colocar etanol 100% e 70% no freezer antes de iniciar a bateria.

1. Separar 24 tubos eppendorffs de 1,5mL; identificar.

2. Pipetar 900µL da solução de lise celular nos primeiros 12 tubos;

3. Adicionar um a um, 300µL de sangue, homogeneizando com a pipeta vagarosamente;

4. Incubar por 10 minutos, invertendo os tubos durante este tempo;

5. Centrifugar em velocidade máxima (14,5rpm) por 45seg.

6. Descartar o sobrenadante invertendo o tubo e sacudindo com cuidado; o que ficará no fundo é um grumo um pouco mais claro que o sangue;

7. Adicionar 400µL de solução de lise nuclear (pode colocar em todos de uma vez), misturando com a ponteira de 1mL, até dissolver o grumo que se formará (ele deve entrar e sair da ponteira de 1mL com facilidade, sem entupir);

8. Adicionar 200µL da solução de precipitação protéica, um a um, misturando com a ponteira de 1mL, até dissolver o grumo que se formará (ele deve entrar e sair da ponteira de 1mL com facilidade, sem entupir);

9. Centrifugar em velocidade máxima por 4 minutos;

10. Transferir 500µL do sobrenadante para o tubo definitivo correspondente (1,5mL) – este volume pode ser variável, porém é importante não aspirar nenhum resquício do sedimentado;

11. Adicionar ao sobrenadante transferido, 600µL de etanol 100% gelado (freezer);

12. Homogeneizar por inversão de tubo, verificando a formação da “nuvem” de DNA;
13. Centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos;
14. Descartar o sobrenadante com cuidado, invertendo o tubo de forma que o precipitado não desprenda e caia no descarte;
15. Adicionar 600 μ L de etanol 70% gelado (freezer), homogeneizando por inversão lenta;
17. Centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos;
16. Repetir etapa 15 e 16;
17. O etanol que sobrar ao redor do “pellet” no fundo do tubo deve ser aspirado com pipeta (100 ou 200 μ L);
18. Deixar o “pellet” secar no ambiente com o tubo aberto por poucos minutos (10 min), sempre observando;
19. Adicionar 200 μ L de solução de rehidratação de DNA ao tubo contendo o “pellet”, misturando com “petelecos”.

ANEXO D: Protocolo de extração de DNA de Carrapato

1. Ligue o banho-maria a 62,5°C. Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente identificados.
2. Para cada extração serão utilizados 700 μ L de tampão de extração. Calcule a quantidade total necessária de tampão de extração com alguns mililitros a mais para segurança. Adicione 2-mercaptoetanol à quantidade necessária de tampão na proporção de 2 μ L de 2-mercaptoetanol para cada mililitro de tampão de extração. Mantenha o tampão de extração aquecido em banho-maria a 62,5 °C.
3. Pese 50 a 100 mg de tecido de carrapato diretamente dentro do microtubo.
4. Mergulhe o microtubo contendo o tecido de carrapato dentro de um recipiente contendo nitrogênio líquido e espere até que o tecido fique bem congelado (crocante) antes de iniciar a maceração.
5. Dentro de um microtubo de 2,0mL macere o tecido utilizando um bastão de vidro por uns 20 a 40 segundos até o tecido se mostrar bem pulverizado. Ao tecido recém macerado adicione 700 μ L de tampão de extração.

6. Misture o tecido no tampão com o auxílio do vortex. Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 62,5 °C por um mínimo de 60 minutos. Esta incubação pode se prolongar até 90 minutos. Durante a incubação agite os tubos a cada 15 minutos para homogeneizar a suspensão.
7. Retire os tubos do banho-maria. Deixe-os esfriar. Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando 600 µL de CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea.
8. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima 18.000xg durante 5 minutos.
9. Retire os tubos da centrifuga cuidadosamente. Evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas, pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo (~500 µL).
10. A fase aquosa no novo tubo adicione 1/5 do volume (~100 µL) de uma solução 5% CTAB, 0.7M NaCl. Misture bem durante 5 minutos até homogeneizar a solução. Repita a extração com 600 µL de CIA (Passos 7, 8 e 9) Retire novamente a fase aquosa superior e transfira-a para um novo tubo.
11. Adicione 2/3 do volume da solução aquosa (~400 µL) de isopropanol frio (-20°C). Misture gentilmente para precipitar os ácidos nucleicos. Se o precipitado não for visível, coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais.
12. Este é um ponto adequado para parar o procedimento de extração se não for possível continuar no mesmo dia.
13. Centrifugue os tubos a 12.000xg em microcentrífuga durante 5 minutos, para formar um *pellet*. Se o *pellet* não for visível coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais, e centrifugue novamente.
14. Gentilmente descarte o máximo possível de sobrenadante sem perder o *pellet*. Este em geral será difuso e solto e estará no fundo ou ao longo da parede do tubo dependendo do ângulo do rotor utilizado.
15. Lave o *pellet* com 1 mL de etanol 70%. Deixe o *pellet* imerso por 5 a 10 minutos. Geralmente o *pellet* fica mais branco a este ponto. Retire o etanol 70%.

16. Lave o *pellet* uma vez em 1 mL de etanol 95% (ou etanol absoluto) durante 2 a 3 minutos. Retire o máximo possível de etanol por capilaridade ou mesmo usando a pipeta. Deixe o *pellet* secar ao ar durante alguns minutos se possível em fluxo laminar, ou seque-os em centrífuga a vácuo.
17. Ressuspenda o *pellet* em 25 a 100 μ L (dependendo do seu tamanho) de tampão TE contendo 10 μ g/mL de RNase A. Incube a 37°C por 30 a 120 minutos para a digestão de RNA.

ANEXO E: Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ / COMEP



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 126/2011

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Aspectos epidemiológicos de Babesia canis E Ehrlichia canis em cães de áreas rurais e urbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini do Departamento de parasitologia Veterinária do Instituto de Veterinária, processo 23083.006049/2011-60, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais em experimentação.

UFRRJ, 11/08 /2011.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Aurea Echevarria Neves Lima'.

Profª. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima

Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação