

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

FLAVIO SHIGUERU JOJIMA¹; JOÃO LUÍS GARCIA²; MARILDA CARLOS VIDOTTO²; MARA REGINA S. BALARIN²; ANDREI KELLITON FABRETTI³; MARCELA R. GASPARINI⁴; ADRIANA LETÍCIA M. COELHO⁴; ODILON VIDOTTO²

ABSTRACT:- 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. [Occurrence and molecular characterization of *Babesia* species in a canine hospital population in the Londrina Region, Parana State, Brazil]. 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, supl. 1, p. 277-283, 2008. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brasil. E-mail: vidotto@uel.br

Canine babesiosis is a worldwide disease caused by the protozoan of *Babesia* genus. *Babesia canis* and *B. gibsoni* are both species that naturally infect dogs. The objective of this study was to evaluate the infection of *Babesia* species in dogs attended at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL). It was selected 282 dogs seen at the Londrina State University Veterinary Teaching Hospital (HV-UEL) between April of 2005 and May of 2006. They presented anemia (Packed Cell Volume < 25%), thrombocytopenia (Platelet count < 150000/mm³), leukopenia (White blood cell count < 5000/mm³) or a combination of two or three of these alterations at the moment of the consultation. The presence of *Babesia* sp was determined by the amplification of a specific fragment of DNA of the *Babesia* genus by PCR. Microscopic examination of Giemsa-stained blood smears detected 38 (13.5%) positive samples against 105 identified by PCR from 282 dogs. The positive samples were submitted to PCR-RFLP by *Hinf I* that allows distinguishing the species of *B. canis vogeli* and *B. gibsoni*. From 282 dogs, *Babesia* sp infection was identified in 105 (37.2%). From these 105 positive samples, the PCR-RFLP identified 66 (23.4%) samples with a profile compatible to *B. canis vogeli* and 39 (13, 8%) to *B. gibsoni*. As conclusions, the results obtained allow to affirm that the babesiose is an important differential for dogs that present anemia, leukopenia and thrombocytopenia and, *B. canis vogeli* is the subspecies that is present in the most of the cases of babesiose in the population of dogs studied and, that *B. gibsoni* is also present causing babesiosis in dogs of the Londrina region, Parana State, Brazil.

KEY WORDS: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, dogs, anemia, leukopenia, thrombocytopenia, PCR.

RESUMO

A Babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Babesia*. *Babesia canis* e *B. gibsoni* são as duas espécies que causam infecção natural em cães. O objetivo do trabalho foi avaliar a infecção por espécies de *Babesia* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, PR. Foram selecionados 282

cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de abril de 2005 a maio de 2006 que apresentavam anemia (VG < 25%), trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150.000/mm³), leucopenia (contagem de leucócitos totais < 5.000/mm³) ou uma combinação de duas ou três dessas alterações no momento da consulta. A presença de *Babesia* sp foi confirmada através da detecção do material genômico do gênero *Babesia* pela PCR. No exame microscópico de esfregaços de sangue corados pelo Giemsa foram detectadas 38 (13,5%) amostras positivas contra 105 identificadas pela PCR do total de 282 amostras examinadas. As amostras positivas foram submetidas à PCR-RFLP com a *Hinf I*, que possibilita a diferenciação das espécies de *B. canis vogeli* e *B. gibsoni*. A infecção por *Babesia* sp foi identificada em 105 (37,2%) cães de um total de 282. Destas 105 amostras positi-

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá, Campus Avançado de Umuarama, PR.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brasil. E-mail: vidotto@uel.br

³ Curso de Medicina Veterinária, UEL, Londrina, PR.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UEL, Londrina, PR.

vas, a PCR-RFLP identificou 66 amostras (23,4%) com perfil de clivagem compatível com a *B. canis vogeli* e 39 (13,8%) com a *B. gibsoni*. Como conclusões, os resultados obtidos permitem afirmar que a babesiose é um importante diferencial para animais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia; *A. B. canis vogeli* é a subespécie que está presente na maioria dos casos de babesiose na população de cães estudadas e a *B. gibsoni* também está presente causando babesiose, em cães da região de Londrina, Paraná.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, cães, anemia, leucopenia, trombocitopenia, PCR.

INTRODUÇÃO

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

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

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

Estudos realizados com isolados brasileiros de babesias de cães mostram que no Brasil a babesiose canina é causada predominantemente pela *B. c. vogeli*, com relatos de ocorrência de *B. gibsoni* no sul do país.

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

cepa Egito 1 verificou-se uma diferença em apenas 2 pares de bases indicando que a subespécie que, provavelmente, está envolvida nos casos de Babesiose no Brasil é *B. c. vogeli*.

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

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

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

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

População de cães

Foram selecionados 282 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de abril de 2005 a maio de 2006 que apresentavam anemia (VG < 25%), trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150.000/mm³), leucopenia (contagem de leucócitos totais < 5.000/mm³) ou uma combinação de duas ou três dessas alterações no momento da consulta. O tamanho da amostra

foi calculado através do programa Epi-Info 6,04b, tendo como universo 1300 cães atendidos no HV-Uel com as alterações mencionadas acima durante o ano de 2004, utilizando uma prevalência de 21,7% (DAGNONE et al., 2003), com estimativa de precisão de 5%, e nível de significância de 95%.

Colheita das amostras

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

Hemograma

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

Esfregaço sanguíneo

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

Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase

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

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

A sensibilidade da técnica foi determinada a partir de uma amostra de sangue com 13% de parasitemia, após extração e diluição do DNA extraído de 10⁻¹ a 10⁻⁷.

Análise do produto amplificado. O produto amplificado na PCR foi visualizado em Gel de Agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5µL/mL) submetido à eletroforese em

cuba horizontal com fonte de 100V/50mA. A leitura foi realizada após aproximadamente uma hora decorrida, em transluminador de luz ultra-violeta, com posterior documentação fotográfica utilizando-se de uma câmera digital (KODAK® DC 290). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produto amplificado de aproximadamente 460 pares de base (pb).

Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction (PCR-RFLP)

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

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Gart e Buck (1966), utilizando-se o método de qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, com $\alpha=5\%$ e intervalo de confiança de 95%. Essa análise estatística foi realizada através do programa Epi-Info 3.3.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR realizada com os "primers" do gênero *Babesia* amplificou uma banda com tamanho molecular aproximado de 460 pb em 105 (37,2%) amostras de sangue de cães de um

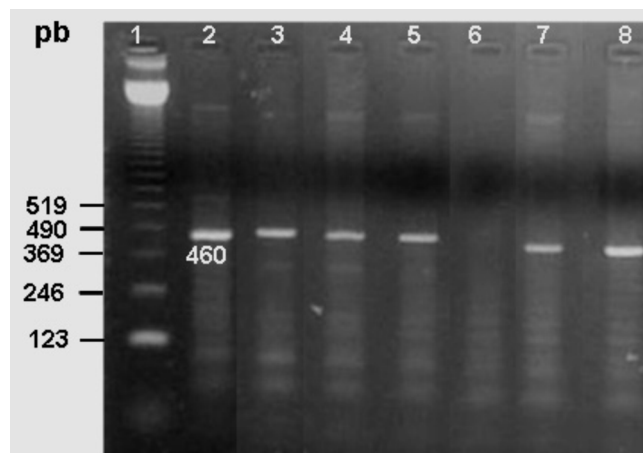


Figura 1. Fotografia de gel de agarose corado com Brometo de Etídeo de produtos de PCR amplificados para o gênero *Babesia* com peso molecular aproximado de 460 pb. 1) Marcador de tamanho molecular (123); 2) Controle positivo para *B. canis*; 3 a 8) Amostras testadas; 9) Água ultra pura.

Tabela 1. Percentagem de amostras positivas para as espécies de *Babesia* obtidas pela PCR e PCR-RFLP em cães.

Nº de Amostras	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
282 (100%)	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)

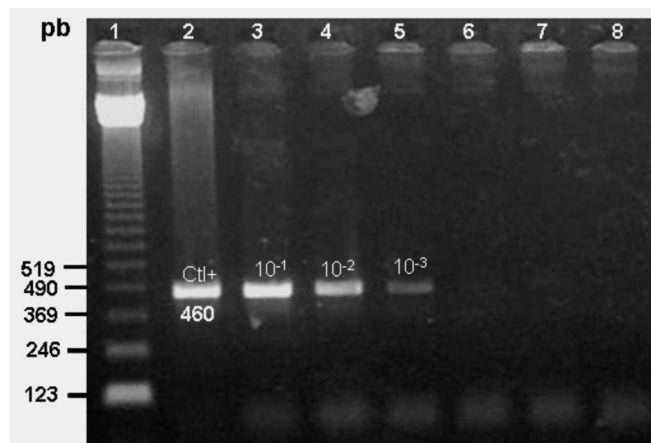


Figura 2. Fotografia de gel de agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídeo de produtos de PCR do gênero *Babesia* com diferentes diluições (sensibilidade da PCR). 1) Marcador de tamanho molecular (123pb); 2) Controle positivo não clivado; 3 a 7) Diluições de 10^{-1} a 10^{-5} ; e 8) Água ultra pura.

total de 282 (Figura 1 e Tabela 1). A diluição de uma amostra de sangue padrão com parasitemia de 13% mostrou que a PCR foi capaz de detectar casos positivos com até $1,3 \times 10^{-3}$ ou 0,013% de parasitemia (Figura 2). Pelo exame microscópico de esfregaços de sangue corados pelo Giemsa foram detectadas 38 (13,5%) amostras positivas contra 105 identificadas pela PCR do total de 282 amostras examinadas (Tabela 2). Apresentou $\chi^2=70,96$ e $p<0,05$, mostrando que há associação entre as técnicas. A comparação dos esfregaços corados por Giemsa e a PCR apresentou $K=0,41$ (moderado 0,41 a 0,60), sensibilidade de 36,2%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 72,54% e eficácia de 76,24%. Isso mostra que a PCR é mais sensível que o exame microscópico de esfregaço corado por Giemsa.

Todas as amostras positivas na PCR foram submetidas à clivagem com a enzima *Hinf I*, obtendo-se 66 (23,4%) com perfil de clivagem compatível com a subespécie *B. canis vogeli* e 39 (13,8%) com a espécie *B. gibsoni* (Figura 3 e Tabela 1). Esses resultados sugerem que a *B. gibsoni* também pode estar

Tabela 2. Correlação dos resultados obtidos pelo Giemsa com os da PCR e PCR-RFLP.

Giemsa	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Positivo	38 (13,5%)	0	23 (21,9%)	15 (14,3%)
Negativo	67 (23,8%)	177 (62,8%)	43 (40,9%)	24 (22,9%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)
	$\chi^2=70,96$	$p<0,05$	$\chi^2=0,03$	$p=0,87$

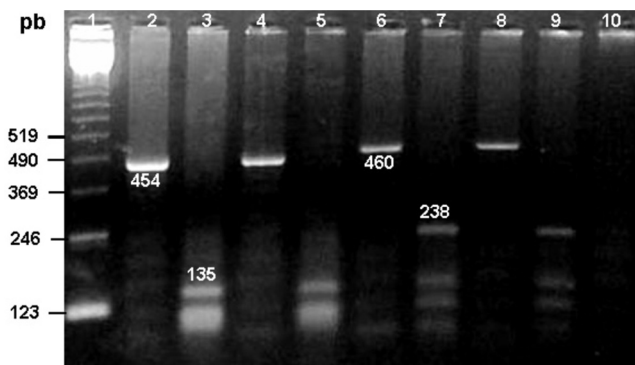


Figura 3. Perfil de clivagem da enzima de restrição *Hinf I* em gel de agarose metaphor a 2% corado com Brometo de Etídeo. 1) Marcador de tamanho molecular (123pb); 2) Controle positivo não clivado; 3) Controle positivo clivado com a enzima de restrição *Hinf I*, com bandas sugestivas de *Babesia canis vogeli*; 4 e 5) Amostra não clivada e clivada, com bandas sugestivas de *B. canis vogeli*; 6 a 9) Amostras não clivadas e clivadas com bandas sugestivas de *B. gibsoni*; e 10) Água ultra pura.

envolvida em casos clínicos de babesiose canina no Brasil, como já havia sido relatado anteriormente por Gothe e Wegerdt (1991) e mais recentemente por Trapp et al. (2006b).

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

No material que foi amplificado para o gênero *Babesia*, verificou-se que 57 de 105 animais (54,3%) apresentaram anemia (volume globular < 25%). Dos 105 cães, 37 (35,2%) tiveram leucopenia (leucócitos < 5000cels/ μ l), e foram positivos para *Babesia* sp. Nos cães que manifestaram trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150.000 cels/ μ l), 61 de 105 animais (58,6%) foram positivos para *Babesia* sp. (Tabela 3).

Constatou-se que 17 de 105 animais (16,2%) apresentaram anemia e trombocitopenia, cinco (4,8%) anemia e leucopenia, seis (5,7%) leucopenia e trombocitopenia e 11

Tabela 3. Correlação dos resultados obtidos pela PCR e na PCR-RFLP e os critérios de inclusão.

Critérios de inclusão	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Anemia	24 (8,5%)	30 (10,6%)	12 (11,4%)	12 (11,4%)
Leucopenia	15 (5,3%)	48 (17,0%)	12 (11,4%)	3 (2,9%)
Trombocitopenia	27 (9,6%)	47 (16,7%)	16 (15,2%)	11 (10,5%)
An+Leuco	5 (1,8%)	2 (0,8%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
An+Trombo	17 (6,0%)	18 (6,4%)	11 (10,5%)	6 (5,7%)
Leuco+Trombo	6 (2,1%)	13 (4,6%)	5 (4,8%)	1 (0,9%)
Ane+ Leuco+Trombo	11 (3,9%)	19 (6,7%)	7 (6,7%)	4 (3,8%)
Total 105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)	
An = Anemia; Leuco = Leucopenia; Trombo = Trombocitopenia				
	$\chi^2=2,04$	$p=0,56$	$\chi^2=0,92$	$p=0,82$

(10,5%) apresentaram anemia, leucopenia e trombocitopenia (Tabela 3).

Em relação às espécies de *Babesia*, foram positivos para *B. c. vogeli*, 33 animais (31,4%) que possuíam anemia, 27 (25,7%) leucopenia e 39 (37,1%) trombocitopenia. Onze (10,5%) apresentaram anemia com trombocitopenia, três (2,9%) anemia com leucopenia, cinco (4,8%) leucopenia com trombocitopenia e sete (6,7%) tinham pancitopenia. Dos animais positivos para *B. gibsoni*, 24 animais (22,9%) apresentaram anemia, 10 (9,5%) leucopenia, 22 (21,0%) trombocitopenia, seis (5,7%) anemia e trombocitopenia, dois (1,9%) anemia e leucopenia, um (1,0%) leucopenia e trombocitopenia e quatro (3,8%) pancitopenia (Tabela 3). Portanto, as alterações mais evidentes foram anemia e trombocitopenia. Em relação às espécies, a *B. canis vogeli* teve a anemia e trombocitopenia como alterações mais frequentes. Sinais que foram compatíveis aos encontrados na Eslovênia onde foi encontrada uma prevalência de 5,9% (DUH *et al.*, 2004) e no Japão onde 6,3% foram positivos para *B. canis* (INOKUMA *et al.*, 2004), porém com índice alto de leucopenia o que não foi encontrado nesses trabalhos. Enquanto que para a *B. gibsoni*, somente a anemia e a trombocitopenia foram os achados mais consistentes. Contudo, o cálculo do teste de χ^2 mostrou que não houve diferença significativa, não havendo associação entre os critérios de inclusão e os resultados da PCR e PCR-RFLP ($\chi^2=11,77$ e $p=0,06$ e $\chi^2=4,86$ e $p=0,56$, respectivamente).

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

Tabela 4. Correlação do sexo dos animais com as espécies de *Babesia*.

Sexo	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Macho	62 (22,0%)	92 (32,6%)	36 (34,3%)	26 (24,8%)
Fêmea	43 (15,2%)	85 (30,2%)	30 (28,6%)	13 (12,4%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)
	$\chi^2=1,06$	$p=0,30$	$\chi^2=1,03$	$p=0,31$

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

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

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

Como conclusões, os resultados obtidos permitem afirmar que a babesiose é um importante diferencial para ani-

Tabela 5. Correlação da raça dos animais com as espécies de *Babesia*.

Raça	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Cocker	5 (1,8%)	10 (3,5%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
Pastor Alemão	11 (3,9%)	13 (4,6%)	5 (4,8%)	6 (5,7%)
Poodle	10 (3,5%)	14 (5,0%)	8 (7,6%)	2 (1,9%)
Rottweiler	5 (1,8%)	11 (3,9%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)
Sem Raça Definida	43 (15,2%)	76 (27,0%)	30 (28,6%)	13 (12,4%)
Outras Raças	31 (11,0%)	53 (18,8%)	17 (16,2%)	14 (13,3%)
Total 105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)	
	$\chi^2=1,37$	$p=0,56$	$\chi^2=4,45$	$p=0,48$

Tabela 6. Correlação da faixa etária dos animais em relação às espécies de *Babesia*.

Faixa etária	PCR		Clivagem	
	Positivo	Negativo	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. gibsoni</i>
Até 1 ano	32 (11,3%)	46 (16,3%)	22 (21,0%)	10 (9,5%)
1 - 5 anos	34 (12,1%)	66 (23,4%)	20 (19,0%)	14 (13,3%)
5 - 10 anos	25 (8,9%)	48 (17,0%)	16 (15,2%)	9 (8,6%)
Acima da 10 anos	14 (5,0%)	17 (6,0%)	8 (7,6%)	6 (5,7%)
Total	105 (37,2%)	177 (62,8%)	66 (23,4%)	39 (13,8%)
	$\chi^2=2,04$	$p=0,56$	$\chi^2=0,92$	$p=0,82$

mais que apresentam anemia, leucopenia e trombocitopenia; a *B. canis vogeli* é a subespécie que está presente na maioria dos casos de babesiose na população de cães estudada e que a *B. gibsoni* também está presente em cães da região de Londrina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, C.V.; MOREIRA, S.M.; PASSOS, L.M.F. Restrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p. 158 – 160, 2004.
- BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asia genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.9, p. 4172 – 4177, 2003.
- BIRKENHEUER, A.J.; NEEL, J.; RUSLANDER, D.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, v.124, n.3-4, p. 151 – 160, 2004.
- BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: GREENE, R.T. *Enfermidades Infecciosas de los Perros y Gatos*. Mexico: Interamericana, 1993. p. 834 – 841.
- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.46, n.3 p. 298 – 301, 1999.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A. de; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.117, n.4, p.285-290, 2003.
- 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.
- DUH, D.; TOZON, N.; PETROVEC, M.; STRASEK, K.; AVSIC-ZUPANC, T. Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Research*, v.35, n.3, p. 363 – 368, 2004.
- FURUTA, P.I.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROCHA, A.G.; TINUCCI-COSTA, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v.13, supl. 1, p. 231, 2004.
- GOTHE, R.; WEGERDT, S. Babesiosis of dogs in Germany: epidemiological case analysis. *Tierärztliche Praxis*, v. 19, n.2, p.170-173, 1991.
- GUIMARÃES, A.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; SANTA-ROSA, I.C.A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. *Clinica Veterinária*, v.41, n.1, p. 60 – 68, 2002.
- INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, v.121, n.3-4, p. 341 – 346, 2004.
- INOKUMA, H.; OKADA, M.; YOSHIZAKI, Y.; HIRAKAWA, H.; MIYAMA, T.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Clinical observation of *Babesia gibsoni* infection with low parasitaemia confirmed by PCR in dogs. *Veterinary Record*, v.156, n.1, p. 116 – 118, 2005.
- KJEMTRUP, A.M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B.L.; CARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia*, identified in California. *Veterinary Parasitology*, v.138, n.1-2, p. 103 – 111, 2006.
- LOBETTI, R.G. Canine Babesiosis. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 20, n.4, p. 418-30, 1998.
- MAIA, M.G.; COSTA, R.T.; HADDAD, J.P.A.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 2007 (in press).
- MARTIN, A.R.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K.; BROWN, G.K. *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology*, v.112, n.1, p. 63 – 65, 2006.
- MATSUO, 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.
- OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H.A.S. Caracterização dos carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 23, n.1, p. 87 – 90, 2002.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n.1-2, p. 81 – 85, 2005.
- TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 2^a ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 473-481.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*, v.140, n.3-4, p. 223 – 230, 2006a.
- TRAPP, S.M.; MESSICK, J.B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S.; MORAIS, H.S.A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs

- from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 141, n.1-2, p. 177-180, 2006b.
- UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M.; SPANJER, A.A.M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Veterinary Quarterly*, v.11, n.1, p. 33 – 40, 1989.
- YAMANE, I.; THOMFORD, J.W.; GARDNER, I.A.; DUBEY, J.P.; LEVY, M.; CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n.12, p. 1579-1584, 1993.
- ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, v.87, n.7, p. 544-548, 1998.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.