

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BABESIOSE CONGÊNITA EM POTROS NEONATOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL*

TIAGO M. SANTOS¹; HUARRISSON A. SANTOS²; CARLOS LUIZ MASSARD³

ABSTRACT:- SANTOS, T.M.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. [Molecular diagnostic of congenital babesiosis in neonates foals from State of Rio de Janeiro, Brazil]. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p.348-350, 2008. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: tiagoufrjr@yahoo.com.br

The aim of this study was to demonstrate, through nested PCR (nPCR) method, the occurrence of congenital babesiosis in two foals born of carrier mares. All mares were positive for *T. equi* based in visualization of intraerythrocytic parasites in blood smears, in indirect fluorescent antibody test (IFAT) and nPCR reactions. Just one mare was nPCR-positive for *B. caballi*. After the birth, all foals presented nPCR-positive for *T. equi*, while just one foal presented nPCR-positive for *B. caballi*. The present study prove the occurrence of congenital babesiosis in new-born foals, however, new studies are necessary to elucidate if the infection occur for transplacental transmission or in parturition moment.

KEY WORDS: Equine Babesiosis, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, Congenital Infection, Neonate Foals.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi demonstrar através da técnica de nested-PCR (nPCR) a ocorrência de babesiose congênita em dois potros nascidos de éguas portadoras. Todas as éguas foram positivas para *T. equi* baseado na visualização de formas intraeritrocíticas em esfregaços de sangue, nas reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e nPCR. Apenas uma égua foi positiva na nPCR para *B. caballi*. Após o nascimento todos os potros se apresentaram positivos na nPCR para *T. equi*, enquanto que apenas um deles apresentou reação positiva para *B. caballi*. O presente estudo comprova a ocorrência de babesiose congênita em potros recém-nascidos, no entanto, são necessários estudos que permitam elucidar se a infecção ocorre por transmissão transplacentária ou no momento do parto.

PALAVRAS-CHAVE: Babesiose Equina, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, Infecção Congênita, Potros Neonatos.

As babesioses dos eqüinos, também conhecida como febre biliar ou piroplasmose eqüina, são doenças causadas por protozoários intraeritrocíticos denominados *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein 1998 e *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912). Animais infectados podem apresentar sinais clínicos de febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria, fraqueza e morte ou mesmo infecções subclínicas.

A transmissão biológica das espécies de babesia ocorre pela picada de carrapatos infectados, que inoculam esporozoítos, estágio infectante, nos hospedeiros através da saliva (UILENBERG, 2006). Dentre os carrapatos envolvidos na transmissão dos agentes das babesioses estão os dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (THOMPSON, 1969). No Brasil, as espécies de carrapatos envolvidos na transmissão de *T. equi* e *B. caballi* são *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (GUIMARÃES et al., 1998) e *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* (MUJICA, 2002), respectivamente.

Além da transmissão biológica por carrapatos, ambos os parasitos podem ser transmitidos de forma iatrogênica ou acidental, através de sangue infectado. Dessa forma, fômites con-

*Sob os auspícios da FAPERJ e CNPq.

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: tiagoufrjr@yahoo.com.br - Bolsista CAPES.

² CPGCV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. - Bolsista FAPERJ.

³ Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ. E-mail: carlosmassard@ufrj.br - Bolsista CNPq.

taminados e picadas de dípteros hematófagos são incriminados como possíveis vias de infecção (GERSTENBERG et al., 1998), porém, não há confirmação científica do papel de dípteros hematófagos na transmissão dos agentes das babesioses (PHIPPS; OTTER, 2004). A transmissão transplacentária foi anteriormente sugerida com base em observações de fetos abortados, infectados com *T. equi* (DU PLESSIS; BASSON, 1966) e em casos clínicos de babesiose em neonatos (DONATIEN et al., 1924; GUIMARÃES et al., 1954; ERBSLOH, 1975). No entanto, somente foi comprovada recentemente por Phipps e Otter (2004) e Allslop et al. (2007).

O objetivo desse estudo foi demonstrar através da técnica de nested-PCR (nPCR) a ocorrência de babesiose congênita em dois potros nascidos de éguas portadoras, no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Assim, foram utilizadas duas éguas mestiças, portadoras de *T. equi*, baseado na visualização de formas intraeritrocíticas do parasito em esfregaço de sangue, na técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e nPCR. Apenas uma das éguas apresentou reação positiva na nPCR para *B. caballi*. Ambas eram provenientes de pastagens infestadas por *R. (B.) microplus*, *D. (A.) nitens* e *Amblyomma* sp. Dois meses anteriores à data prevista para o parto, as éguas foram mantidas em baias individuais, isoladas e submetidas, diariamente, à inspeção visual e manual quanto à presença de estágios de carrapatos. Semanalmente, as éguas foram banhadas com solução carrapaticida a base de cipermetrina 15% até o momento do parto. Durante todo o período as éguas receberam dieta a base de ração concentrada comercial e feno de capim *Coastcross* procedente de áreas livres de carrapatos. As medidas profiláticas descritas acima foram realizadas, a fim de eliminar qualquer possibilidade dos potros se infestarem com carrapatos.

As amostras de sangue dos potros foram colhidas no máximo 12 horas após o parto, por venopunção jugular em tubo do tipo *vacutanier* com anticoagulante EDTA. Posteriormente, parte de cada amostra de sangue foi acondicionada em eppendorf de 1,5 mL e mantidas em frizer à -20°C até a extração de DNA. Para extração, utilizou-se o *Kit Easy-DNA*TM (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizada a técnica de nPCR para amplificação do gene *ema-1* de *T. equi* realizada segundo metodologia descrita por Nicolaiewsky et al. (2001), utilizando os *primers* EMAE-F e EMAE-R na primeira reação e os *primers* EMAI-F e EMAI-R na segunda reação. Quatro primers foram utilizados na nPCR para amplificação do gene BC48, específico para *B. caballi*. Na primeira reação, utilizaram-se os *primers* BC48F1 e BC48R3 (IKADAI et al., 1999) e na segunda reação os *primers* BC48F11 e BC48R31 (BATTSETSEG et al., 2001). Os produtos finais das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE, corados com brometo de etídio e visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta (BIO RAD).

Após a realização da nPCR, os potros neonatos apresentaram-se positivos para *T. equi* com amplificação do fragmento do gene *ema-1* com 102 pb, específico para *T. equi* (Figura

1). No presente estudo, é praticamente impossível que outra forma de infecção se não a congênita tenha ocorrido. Isso se justifica pelo fato de as coletas terem sido realizadas até 12 horas pós-parto, uma vez que os carrapatos transmissores somente se tornam infectivos alguns dias após a fixação no hospedeiro, devido a maturação dos esporozoítos (UILENBERG et al., 2006). Além disso, não houve qualquer parasitismo por carrapatos nos neonatos após o nascimento.

A transmissão transplacentária de *T. equi* foi sugerida por Du Plessis e Basson (1966) e Erbsloh (1975) como resultado de placentação anormal, que permitiria a mistura entre o sangue materno e fetal. Ainda sugeriram que casos de eritroblastose fetal reversa poderiam permitir a passagem do parasito através da placenta. Na Inglaterra, Phipps e Otter (2004) demonstraram infecção por *T. equi* em dois potros, através da visualização do parasito em esfregaço de sangue e presença de anticorpos anti-*T. equi* pela reação de fixação do complemento e RIFI. Segundo os autores, a rota mais provável da transmissão foi a transplacentária, porém, os potros tinham dois e cinco anos de idade, fato que torna os resultados do presente estudo mais fidedignos.

Recentemente, Allslop et al. (2007) determinaram, através da técnica da PCR, que a transmissão transplacentária de *T.*

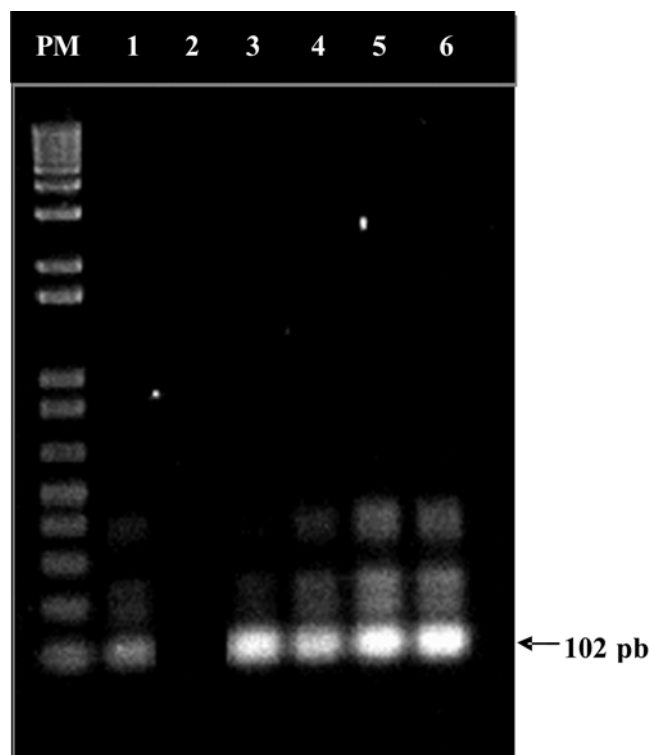


Figura 1. Nested-PCR para amplificação do DNA de *Theileria equi* isolado do sangue de equinos utilizando a sequência do gene *ema-1* com 102 pb e primers externos EMAE-F e EMAE-R e primers internos EMAI-F e EMAI-R. M: Marcador de DNA 1 Kb plus; 1: Sangue de equino sabidamente infectado (controle positivo); 2: Sangue de equino não infectado (controle negativo); 3 e 5: nPCR com DNA das éguas; 4 e 6: nPCR com DNA dos potros neonatos. O comprimento dos pares de bases representado pelo tamanho do marcador é mostrado à direita.

equi pode ocorrer no início do desenvolvimento fetal, aos quatro meses de gestação e em prenhez onde a placentação é normal. Segundo estes autores, tal mecanismo de transmissão pode ser específico da fisiologia gestacional equina. O feto equino utiliza como fonte de nutrientes, inicialmente, o conteúdo do saco vitelínico (nutrição embriônica) e posteriormente, uma mistura de secreções de glândulas uterinas, células epiteliais descamadas e eritrócitos de origem materna (nutrição histotrófica). Além de servirem como fonte de ferro, os eritrócitos maternos parasitados por *T. equi* podem ultrapassar a placenta em desenvolvimento e infectar o feto. Baseado nesse mecanismo é possível também que *B. caballi* possa infectar o feto. No presente estudo, um dos potros, também foi positivo na nPCR para *B. caballi*. Devido à falta de registros na literatura que comprove a possibilidade de transmissão transplacentária de *B. caballi* e, por utilizar somente dois animais no presente estudo, não se pode afirmar que essa espécie de hemoparasito possa ser transmitida através da placenta. Segundo De Waal e Heerden (2004), *B. caballi* apresenta baixa parasitemia, o que dificulta a possibilidade de infecção via placenta. A infecção, nesse caso, pode ter ocorrido pelo contato do potro com o sangue materno no momento do parto, uma vez que resultados falso-positivos na nPCR são improváveis.

O presente estudo é o primeiro relato no Brasil que comprova, através de técnica molecular, a ocorrência de babesiose congênita em potros neonatos. No entanto, são necessários novos estudos no sentido de elucidar se a infecção ocorre por transmissão transplacentária ou no momento do parto, além de estabelecer o papel da infecção congênita na cadeia epidemiológica das babesioses equina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLSOP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, v. 148, n. 2, p. 130–136, 2007.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* e *Theileria equi* in *Dermacentor nuttalli* adults ticks. *Internacional Journal of Parasitology*, v. 31, n. 4, p. 384–386, 2001.
- DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmosis. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford: Southern Africa, 2004, p. 425–434.
- DONATIEN, A.L.; LESTOQUARD, F.; SAUSEAU, E.; MAUBARET, P. Transmission de *Piroplasma caballi* the la mere au foetus. *Bulletin Société Pathologie Exotique*, v. 27, n. 1, p. 433–435, 1924.
- DU PLESSIS, J. L.; BASSON, P. A. Babesiosis in aborted equine foetuses: a report on two cases in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*. v. 37, n. 1, p. 267–269, 1966.
- ERBSLOH, J. K. E. Babesiosis in the newborn foal. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, v. 23, n. 1, p. 725–726, 1975.
- GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R.; PHIPPS, L. P. Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horse. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 8, 1998. *Proceedings...* Dubai, Newmarket. R & W Publications, 1998. p. 217–222.
- GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v. 84, n. 4, p. 323–327, 1998.
- GUIMARÃES, L. M.; ARAÚJO, T. L.; SALLES GOMES, C. E. Nutaliose congênita em potros puro sangue de corrida no estado de São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo*, v. 5, n. 2, p. 183–186, 1954.
- IKADAI, H.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TANAKA, S.; KANEMARU, T.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Cloning and expression of a 48 kDa *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3475–3480, 1999.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*, v. 84, n. 6, p. 467–475, 1998.
- MUJICAL, F. F. *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912): patogenia, transmissão e alterações hemocitárias no carapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas. 2002. 80f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.
- NICOLAIEWSKY, T. B.; RICHTER, M. F.; LUNGE, V. R.; CUNHA, C. W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, S.; FONSECA, A. S.; SILVA, S. S.; OZAKI, L. S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 1, p. 9–21, 2001.
- PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, v. 154, n. 13, p. 406–408, 2004.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 155, n. 2, p. 454–457, 1969.
- UILENBERG, G. Babesia - A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1, p. 3–10, 2006.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.