

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE MICRORGANISMOS DO GÊNERO *Babesia* EM CÃES DE GOIÂNIA, GO, BRASIL.

DUARTE, Sabrina Castilho; **ROMANOWISKI**, Tatiana de Azevedo Nunes; **NETO**,
Oswaldo José da Silveira; **LINHARES**, Guido F. C.

Endereço: Escola de Veterinária Campus II Cx postal 131 CEP: 74001-970. Telefone (62)521-1582 ramal 24

email: sabrinacd@gmail.com

INTRODUÇÃO

A babesiose canina é uma enfermidade infecciosa de grande importância na clínica de cães, causada por hematozoários intraeritrocitários obrigatórios do gênero *Babesia*. São conhecidas duas espécies capazes de provocar infecção natural em cães. A *Babesia canis*, de ocorrência mundial, com maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais (TABOADA et al., 1991), e *Babesia gibsoni*, encontrada predominantemente na Ásia e com menor frequência na América do Norte, Norte e Leste da África (LOBETTI, 1998; KJEMTRUP et al., 2000) e, mais recentemente, encontrada na Europa (CASAPULLA et al., 1998) e relatada na Região Sul do Brasil por BRACCINI et al (1992).

Mundialmente são reconhecidas três sub-espécies de *B. canis*: *B. canis canis*, encontrada na Europa, *B. canis vogeli*, no Norte da África e América do Norte e *B. canis rossi* encontrada no Sul da África (UILENBERG et al., 1989; CARRET et al., 1999; CACCIO et al., 2002).

As espécies de *Babesia* podem ser diferenciadas com base na avaliação morfométrica ao exame microscópico direto do esfregaço sanguíneo. A *B. gibsoni* é um parasito pequeno, com tamanho de 1,0 µm x 3,2 µm, normalmente encontrado em formas isoladas no interior das hemácias. Enquanto que *B. canis* é um parasito do grupo das “grandes babesias”, medindo em torno de 2,4 µm x 5,0 µm e, quando observada microscopicamente, se apresenta aos pares no interior das hemácias (HOSKINS, 1991).

As espécies de *Babesia* se diferenciam, além da morfologia e patogenicidade para o hospedeiro vertebrado, pela adaptação às espécies de vetores potencialmente capazes de atuarem na transmissão. A *B. gibsoni* é transmitida pelos carrapatos *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus sanguineus* e a *Babesia canis* por *R. sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*. Alguns autores reportaram ainda a transmissão experimental de *B. canis* por *Dermacentor andersoni* e *Hyalomma marginatum* (HOSKINS, 1991).

A *B. canis rossi* é transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* e causa infecção fatal caracterizando sua alta patogenicidade. *B. canis vogeli* é transmitida pelo carrapato *R. sanguineus* e determina infecção moderada. A *B. canis canis* é transmitida pelo *D. reticulatus* e apresenta a menor patogenicidade, entre as demais sub-espécies (UILENBERG et al, 1989).

Entre estas espécies de carrapatos, apenas o *R. sanguineus* tem ocorrência confirmada no Brasil, apresentando uma ampla distribuição geográfica (RIBEIRO et al, 1990, PASSOS et al., 2005). No entanto, a introdução de outras espécies de carrapatos em função do crescente movimento de cães entre fronteiras

de diferentes situações epidemiológicas, motivado pelo comércio internacional de animais, pode contribuir para a expansão da distribuição geográfica dos mesmos (ZHALER et al., 1998).

Todos os estádios dos carrapatos podem transmitir, entretanto os adultos (machos e fêmeas) são considerados os principais transmissores por apresentarem maior quantidade de esporozoítos na saliva. Os carrapatos podem permanecer infectivos por várias gerações (RISTIC, 1988; LOBETTI, 1998).

A enfermidade acomete cães domésticos e canídeos silvestres apresentando sinais clínicos múltiplos e variáveis, de acordo com a evolução clínica, fatores genéticos, raça, idade, estado imune, condições de estresse e espécie ou cepa do parasito. A doença pode ocorrer nas formas hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica (ROSA et al., 2002).

Em geral, a enfermidade se manifesta clinicamente por pirexia, anorexia, letargia, fraqueza, anemia hemolítica, icterícia e hemoglobinúria, acompanhada por infecção intra-eritrocitária pelos hematozoários do gênero *Babesia*. Sinais como incordenação motora, ataxia e depressão podem ocorrer em casos que envolvam cepas capazes de desencadear formas nervosas da enfermidade pela localização em capilares do sistema nervoso central (GOODGER, 1998).

Diferentes patogenicidades entre sub-espécies foram descritas por SCHETTERS et al., (1997) em estudo comparativos entre *B. canis canis* e *B. canis rossii*. A *B. canis rossii* demonstrou grande patogenicidade comparada a *B. canis canis*.

Para a caracterização molecular das espécies e sub-espécies do gênero *Babesia* tem sido utilizado a análise filogenética de fragmentos do gene SSU rRNA amplificados por PCR (UILENBERG et al., 1989; CARRET et al., 1999; CACCIO et al., 2002). Ou ainda, através de análises de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de produto previamente amplificado por PCR, referente ao gene SSU rRNA (ZHALER et al., 1998).

No Brasil a babesiose canina, apesar de ser considerada uma enfermidade endêmica (RIBEIRO et al., 1990; O'DWYER, 2000), tem sido pouco estudada em nível de biologia molecular. No único estudo publicado, até a presente data, PASSOS et al. (2005) realizaram a caracterização molecular da sub-espécie *B. canis vogeli* em amostras provenientes de cães das cidades de Belo Horizonte, Uberlândia, Lavras e São Paulo.

Para a região Centro-Oeste não existem referências na literatura sobre as questões envolvendo a etiologia da babesiose canina em nível de espécies e sub-espécies.

O diagnóstico laboratorial, executado pelos laboratórios particulares e de instituições de ensino é feito, geralmente, com base na identificação microscópica dos parasitos em lâminas de esfregaços sanguíneos coradas, atribuindo o nome de *B. canis* às formas de trofozoítos e merozoítos intra-eritrocitários, independentemente de suas dimensões. A experiência de inúmeros profissionais que atuam no diagnóstico de hemoparasitoses de cães, na região, aponta para a ocorrência de formas morfológicas intra-eritrocíticas variadas. Sendo que em alguns momentos prevalecem formas pequenas e em outros, formas grandes.

Na cidade de Goiânia ocorre casuística freqüente de cães doentes por enfermidades determinadas por hemoparasitos, dentre elas a babesiose representa grande parte do total avaliado. É possível observar diferentes intensidades clínicas da enfermidade nos cães que pode ser atribuído a diversos fatores como também a

possibilidade de diversidade de espécies, já que existem poucos estudos sobre o assunto.

O presente projeto tem como objetivo realizar estudo sobre a etiologia da babesiose canina em Goiânia, Estado de Goiás. Para esta finalidade serão desenvolvidas pesquisas visando à caracterização morfológica e molecular de isolados de organismos do gênero *Babesia*.

METODOLOGIA

O projeto está sendo executado no Hospital Veterinário e no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Cães com suspeita clínica de babesiose canina, com ou sem histórico recente de infestação por carrapatos, foram avaliados clinicamente. Desses animais, foram colhidas amostras de sangue da veia jugular, em tubo esterilizado contendo EDTA (Anticoagulante Universal, Doles).

As amostras de sangue foram utilizadas para o preparo de esfregaços sanguíneos e para a extração de DNA total. Adicionalmente, para o diagnóstico microscópico foram colhidas amostras de sangue capilar, conforme HOSKINS (1991). Os esfregaços serão fixados pelo metanol e corados pelo método de Giemsa.

Os esfregaços sanguíneos foram analisados microscopicamente para verificar a presença de formas parasitárias típicas para organismos do gênero *Babesia*.

As amostras positivas foram submetidas ao processo de extração do DNA total, por meio de *kit* comercial (*GFX-Genomic Blood DNA Purification Kit, Pharmacia, Biotech*[®]). As etapas de extração foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As amostras obtidas foram alíquotadas em tubos tipo Eppendorf, de 0,25mL, e armazenadas à -20 °C para, posteriormente, serem utilizadas para a realização teste moleculares.

Os testes moleculares serão realizados para a identificação de sub-espécie de acordo com ZÄHLER et al. (1998) utilizando-se primers universais para o gênero *Babesia*. Os fragmentos obtidos serão submetidos à digestão enzimática pela enzima de restrição SAU 96I (New England, Biolabs, Schwalbach, Germany) e será colocado juntamente com marcadores moleculares de 100 pb (pares de base) em gel de agarose a 1,3 %.

RESULTADOS ESPERADOS

Com a realização do projeto de pesquisa, espera-se alcançar informações precisas, novas e importantes para o conhecimento da etiologia da babesiose canina no Estado de Goiás, tanto em nível de espécies, como sub-espécies.

CONCLUSÕES

Ainda não existem resultados que permitam conclusões sobre esse trabalho, pois o mesmo ainda encontra-se em andamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRACCINI, G.L., CHAPLIN, E.L., STOBBE, N.S., ARAUJO, F.A.P., SANTOS, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the veterinary faculty of the federal university of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986 – 1990. *Arq. Fac. Vet., UFRGS*, v.20, p.134–149, 1992.
- CACCIO, S.M., ANTUNOVIC, B., MORETTI, A., MANGILI, A., 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. *Vet. Parasitol.*, v.106, p.285–292, 2002.
- 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. *J. Euct. Microbiol.*, v.46, p.298–303, 1999.
- CASAPULLA, R.L. BALDI, V., AVALLONE, R., SANNINO, L., PAZZANESE, L., MIZZONI, V. Canine piroplasmosis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. *Vet. Rec.*, v.142, p.168–169, 1998.
- GOODGER, B.; WRIGHT, I.C. Pathogenesis of babesiosis In RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals as man*. Boca Raton: CRC Press, 1998, p.99–118.
- GUIMARAES, J.H., TUCKI, E.C., BARROS - BATTESTI, B. *Ectoparasitos de importância veterinária*. Plêiade – Fapesp: São Paulo, 2001, 218p.
- HOSKINS, J.D. *Veterinary clinics of North America*. Philadelphia: Saunders Company, 1991, v.21, n.01, 201p.
- 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. *Int. J. Parasitol.*, v.30, n.14, p.1501-1505, 2000.
- LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. v.20, n.4, p.418-431, 1998.
- 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 (Doutorado). Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 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. *Vet. Parasitol.*, v.127, p.81–85, 2005.

- RIBEIRO, M.F.B., PASSOS, L.M.F., LIMA, J.D., GUIMARÃES, A.M. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, n.42, p.511–517, 1990.
- RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals as man*. Boca Raton: CRC Press, 1998, p.119–130.
- ROSA, I.C.A., OLIVEIRA, I.M.F.S., GUIMARÃES, A.M. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais, *Clín. Vet.*, v.7, n.41, p.60–68, 2002.
- SCHETTERS, T.P.M.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitol.*, v.115, p.485-493, 1997.
- TABOADA, J., MERCHANT, S.R. *Babesiosis of companion animals and man. Tick transmitted diseases*. v.21, n.1, p.103–123, 1991.
- UILEMBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Quart.*, v.1, p.33-40, 1989.
- ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.*, v.84, p.544–548, 1998.