

T636.023 69

B583u

2001

Kelly Alves Bicalho

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE *Babesia canis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro
Colaborador: Dr. Olindo Assis Martins-Filho

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

27.11.01

1524401-06

0322-05860

B583u
2001

Bicalho, Kelly Alves, 1972-

Uso da citometria de fluxo para detecção de *Babesia canis* / Kelly Alves Bicalho. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

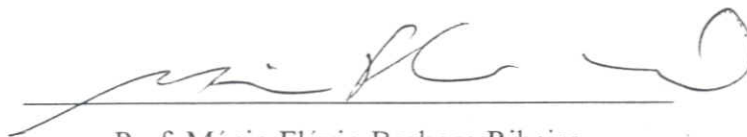
78p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Babesiose em cão - Diagnóstico – Teses. 3. Citometria de fluxo – Teses. 4. Imunofluorescência – Teses. I. Título.

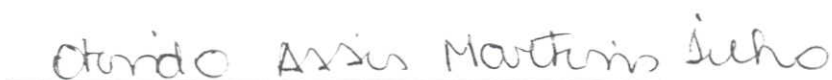
CDD – 636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 01 de junho de 2001, pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Orientador



Dr. Olindo Assis Martins - Filho

Colaborador



Prof. Joaquin Herman Patarroyo Salcedo



Profa. Lygia Maria Friche Passos



Prof. Romário Cerqueira Leite

*Aos meus pais
Altair e Elizabeth pela oportunidade*

*"Escrever é julgar a si mesmo."
Henrik Ibsen*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, que participou intensivamente da minha formação acadêmica e me deu um grande exemplo de orientação segura, dedicação, paciência, amizade e dignidade como pesquisador e ser humano.

Ao Dr. Olindo Assis Martins – Filho, pela co-orientação, paciência, sistemática e pelo seu comprometimento com a ciência e exemplo de pesquisador.

Ao Prof. Romário Cerqueira Leite, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFG, pela amizade e infra-estrutura técnica, facilitando a realização deste trabalho.

À Prof. Lygia M. Friche Passos, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFG, pela colaboração, sugestões, ensinamentos da língua inglesa e disponibilidade de seu laboratório, onde foi desenvolvida grande parte deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Correa-Oliveira, pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou, pela colaboração ao disponibilizar o uso do seu laboratório.

Ao Prof. Paulo Roberto de Oliveira do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva EV-UFG, pela amizade, apoio nos momentos difíceis e pelo glossário de inglês.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV – UFG, pela colaboração, durante as análises estatísticas.

À Prof. Lígia Miranda Ferreira Borges, do Departamento de Parasitologia do IPTSP - UFG, pela amizade e colaboração durante as análises da dados.

Aos colegas Ricardo, Prof. Israel, André e D. Sônia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFG, pela amizade e colaboração.

Ao pesquisador Daniel Stancek, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFG, pelos ensinamentos da língua inglesa e pela amizade.

À Nádia, funcionária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFG, pela grande ajuda prestada na finalização e apresentação deste trabalho, pela amizade e pelas festas.

Ao grande amigo Guilherme, o Gonzagão, pela colaboração e amizade.

Às estagiárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva EV-UFG, Patrícia, Betânia, Mariela, Cláudia e Lílian pela colaboração e amizade.

Aos colegas dos Laboratórios de Doença de Chagas e Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou, pela alegre convivência, apoio e ensinamentos: Andréa, Flávia, Alexandre, Juliana, Roberta, Vanessa, Ricardo, Gustavo, Danielle, Renato, Ariane, André, Cláudia, Jeff, Stefan, Clari, Tisa e Taciana.

À todos os cães, que foram fundamentais na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da EV-UFG, que se disponibilizaram a separar amostras para este trabalho.

Às colegas da clínica Veterinária Kriar: Terezinha, Daniela e Ludmilla, pelo apoio, amizade e oportunidade.

Ao Dr. Vitor Márcio Ribeiro, da clínica Veterinária Santo Agostinho, pela boa vontade na coleta de material.

Ao Dr. Roberto Elísio e sua filha Daniela de Castro e Silva, pela revisão ortográfica.

Às amigas Cláudia e Luciana pela arte gráfica, impressão deste material e apoio nos momentos de lazer.

Aos meus queridos pais, irmãos, tios, familiares e amigos pela compreensão e apoio.

Ao colegiado de Pós-Graduação da EV-UFMG, pela concessão da bolsa da Capes.

À Deus, pela saúde.

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	15
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	17
3. LITERATURA CONSULTADA.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Local de realização do experimento.....	25
4.2. População de cães estudada.....	25
4.3. Amostras de <i>Babesia canis</i> utilizada.....	26
4.4. Padronização da técnica de citometria de fluxo para detecção de hemácias parasitadas com <i>B. canis</i>	26
4.4.1. Fixação de hemácias.....	26
4.4.2. Sistemas marcadores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo....	27
Estudo de hemácias parasitadas marcadas com PI	27
4.4.3. Estudo de hemácias parasitadas marcadas com HE.....	28
4.4.4. Obtenção dos dados de citometria da fluxo	28
4.4.5. Limiar de reatividade	31
4.4.6. Estudo longitudinal de cães inoculados experimentalmente com <i>B. canis</i> por citometria de fluxo.....	31
4.5. Emprego da citometria de fluxo no diagnóstico de <i>B. canis</i> nas clínicas veterinárias	31
4.6. Pesquisa de anticorpos anti- <i>B. canis</i>	31
Análise estatística.....	31
4.7.	
4.8.	
5. RESULTADOS	31
5.1. Comportamento das amostras de <i>B. canis</i>	31
5.2. Padronização da técnica de citometria de fluxo para detecção de hemácias parasitadas com <i>B. canis</i>	34
5.2.1. Fixação de hemácias.....	34
5.2.2. Sistemas marcadores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo....	34
Limiar de reatividade	53
5.2.3. Estudo longitudinal por citometria de fluxo de cães inoculados com <i>B. canis</i>	53
5.2.4. Emprego da citometria de fluxo no diagnóstico de <i>B. canis</i> nas clínicas veterinárias	61
5.2.5.	
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÕES.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fixação de hemácias	27
Tabela 2.	Marcação com Iodeto de Propídeo (PI) de hemácias parasitadas com <i>B. canis</i> e fixadas em Glutaraldeído 0,25%.....	28
Tabela 3.	Infecção experimental de cães com <i>Babesia canis</i> isoladas em Belo Horizonte e Lavras, 2000	34

Figura 7.	Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de sangue total de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP	45
Figura 8.	Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão sangue total de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP	47
Figura 9.	Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP	49
Figura 10.	Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP	
Figura 11.	Análise de PHFP de cães infectados e não infectados com <i>Babesia canis</i>	53
Figura 12.	Inoculação experimental de <i>Babesia canis</i> de Belo Horizonte em um cão: média semanal de parasitemia capilar (SC) e venosa (SV), hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP)	57
Figura 13.	Inoculação experimental de <i>Babesia canis</i> de Lavras em um cão: acompanhamento diário de parasitemia capilar (SC) e venosa (SV), hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP)	57
Figura 14.	Parâmetros laboratoriais de um cão controle negativo: esfregaço de sangue capilar (SC) e venoso (SV), hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP)	59
Figura 15.	Parâmetros laboratoriais de cães atendidos em clínicas veterinárias de Belo Horizonte: Esfregaço sangüíneo (ES) positivo para <i>B. canis</i> , RIFI 1:40, Hematócrito ≤ 30 (HT), Porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).....	61
Figura 16.	Análise da proporção de PHFP positivo/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes valores de hematócrito.	63
Figura 17.	Análise da proporção de RIFI 1:40/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes valores de hematócrito.	63
Figura 18.	Análise da proporção de PHFP positivo/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes títulos de RIFI	65

RESUMO

A técnica de citometria de fluxo foi avaliada para detecção de hemácias parasitadas com *Babesia canis*. Na padronização da técnica foram testados Iodeto de Propídeo e Hidroetidina, como marcadores das hemácias parasitadas. Hidroetidina apresentou melhores resultados e foi utilizada nos demais experimentos. Cães controle e experimentalmente infectados com *B. canis* foram acompanhados por citometria de fluxo e esfregaços sangüíneos, capilar e venoso, por períodos de 21 a 195 dias. Nos esfregaços sangüíneos as primeiras hemácias parasitadas foram detectadas no segundo dia após inoculação, com pico de parasitemia capilar e venosa ocorrendo na primeira semana. Após este período, a presença do parasito passou a ser um achado inconstante, com eventuais períodos de ausência, que não obedeceram a um padrão de comportamento. Quanto à citometria de fluxo, a detecção do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) ocorreu no terceiro dia após inoculação, permanecendo positivo. Foram colhidas 162 amostras sangüíneas de cães atendidos em clínicas veterinárias de Belo Horizonte, Minas Gerais, com diferentes suspeitas clínicas. As amostras de sangue foram submetidas avaliação do hematócrito e pesquisa de *B. canis* através de esfregaços sangüíneos e da técnica de citometria de fluxo. O soro foi submetido a pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os resultados mostraram que apenas 2,5% dos animais foram positivos nos esfregaços sangüíneos, enquanto que 22,8% foram positivas por citometria de fluxo e 60,5% foram positivos por RIFI. Foi observada forte correlação entre os animais positivos por citometria de fluxo e hematócrito ≤ 30 . Houve associação das amostras positivas, com sinais clínicos de mucosas pálidas, letargia e com suspeitas clínicas de hemoparasitose e neoplasia.

Palavras-chave: *Babesia canis*, citometria de fluxo, diagnóstico, RIFI, cães.

ABSTRACT

Flow cytometry was used for detection of *Babesia canis* in infected erythrocytes. Propidium iodide and Hydroethidine were used as markers for the labeling of infected parasites erythrocytes. Hydroethidine gave the best results and therefore it was used throughout the experiments. Control and infected dogs were observed from 21 to 195 days after infection. During this period smears were made from venous and capillary blood and flow cytometry was carried out with venous blood samples. In blood smears the first parasites were detected on the second day after inoculation, with the peak parasitemia in capillary and venous blood occurring on the third day. After this period the presence of the parasite became inconstant, with periods of absence which didn't correspond to a general pattern. As far as flow cytometry is concerned, were detected fluorescent positive erythrocytes (FPE) on the third day after inoculation until the end of the experiment (192 dias). Blood samples were collected from 162 dogs examined by clinicals in Belo Horizonte, MG, with different clinical suspects and were tested for *B. canis* by flow cytometry and by blood smears. Serum samples were tested by IFAT. The results showed that 2.5% of the dogs were positive by blood smears, while 22.8% were positive by cytometry. Among serum samples, 60.5% were positive by IFAT. A high correlation was observed between the animals with FPE and haematocrit ≤ 30 . The FPE was associated with clinical signals such as pale mucous, letargia and with suspect haemoparasitoses and neoplasias. There was no association between FPE and IIFAT titres.

Key words: *B. canis*, flow cytometry, diagnostic, IFAT, dogs.

1 INTRODUÇÃO

Babesia canis é um dos agentes etiológicos da babesiose canina, doença parasitária de cães domésticos e canídeos silvestres, encontrada em regiões tropicais, subtropicais e em climas temperados (Shaw, 2001).

No Brasil, o carrapato trioxeno *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), tem sido incriminado como o vetor da babesiose canina. Este ectoparasito está bem adaptado aos centros urbanos, sugerindo que a enfermidade tenha alta prevalência no país. Ribeiro et. al(1990) e Spiewak (1992), ao estudarem a frequência de anticorpos anti-*B. canis* em Belo Horizonte, MG, Brasil, relataram o aspecto endêmico da ocorrência de babesiose canina.

Parte do ciclo biológico da *B. canis* ocorre na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, onde o parasita invade hemácias, nas quais cresce e se multiplica. O estágio da infecção sanguínea é o mais relevante, por causar sintomas clínicos e até mesmo morte dos animais. Apesar dessa enfermidade possuir tratamentos eficazes e exequíveis, os estudos que focalizam a correlação entre o desenvolvimento de diferentes formas da infecção e o seu diagnóstico são escassos, constituindo um entrave na clínica veterinária (Assis, 1993).

Dentre os principais aspectos abordados nos estudos que avaliam a infecção de canídeos por *B. canis*, duas áreas de conhecimento são bastante investigadas. Alguns estudos visam compreender melhor os mecanismos imunológicos e patofisiológicos envolvidos na resistência e patogênese da doença. Outros estudos focalizam a busca de novos métodos que possam aprimorar o diagnóstico etiológico da infecção, através de técnicas de maior especificidade e sensibilidade, principalmente nos casos atípicos e crônicos da infecção por babesiose canina.

Com relação ao diagnóstico da babesiose canina podemos observar dois momentos

distintos: o diagnóstico clínico e o diagnóstico laboratorial. No que se refere ao diagnóstico clínico, as principais dificuldades estão associadas as diferentes formas de manifestação clínica da infecção e ao diagnóstico diferencial com outras enfermidades como leptospirose, erlichiose, anemia, cinomose e hepatite, que podem apresentar sinais clínicos similares.

Com relação ao diagnóstico laboratorial, a utilização de esfregaço sanguíneo, empregando-se sangue capilar ou venoso, embora tenha alta especificidade, apresenta como limitação baixa sensibilidade, devido a escassez do parasito na fase crônica (Breitschwerdt, 1983). Ainda com relação ao diagnóstico laboratorial, a sorologia através da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), apesar de apresentar alta sensibilidade na fase crônica, apresenta como limitação soroconversão tardia (10 a 42 dias após o início da infecção), além de não identificar infecção ativa. (Ristic et al., 1988; Assis, 1993).

Considerando assim, as limitações e desafios do diagnóstico da babesiose canina, a introdução da citometria de fluxo, como novo método de análise de hemácias parasitadas com *Plasmodium* sp (Janse & Vianen, 1994) e *Babesia* sp (Wyatt et al., 1991; Davis et. al., 1992; Fukata et al., 1996), trouxe uma nova perspectiva para a identificação e acompanhamento dos estágios de desenvolvimento e susceptibilidade a drogas destes hemoparasitos. A citometria de fluxo tem mostrado ser uma técnica rápida, sensível, com boa aplicabilidade e reprodutibilidade nos testes interlaboratoriais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade da técnica de citometria de fluxo para detecção de *Babesia canis* em cães infectados.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os marcadores Iodeto de Propídeo e Hidroetidina na detecção de *Babesia canis* em hemácias parasitadas.
- Avaliar a técnica de Citometria de Fluxo e de esfregaços sangüíneos no acompanhamento de cães experimentalmente infectados com *B. canis*.
- Verificar a aplicabilidade da citometria de fluxo na detecção de *B. canis* em cães atendidos em clínicas de pequenos animais, em relação a esfregaços sangüíneos e outras metodologias convencionais.

3 LITERATURA CONSULTADA

A babesiose canina é causada por protozoários pertencentes à ordem Piroplasmorida, família Babesiidae, que parasita exclusivamente hemácias de cães e canídeos silvestres. Está amplamente distribuída pelo mundo sendo endêmica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Nair et al., 1979; Farwell et al., 1982; Klinefelter, 1982).

Esta enfermidade pode ser causada por *Babesia canis* (Piana, Galli-Valerio, 1895) ou *Babesia gibsoni* (Patton, 1910), que podem ser diferenciadas pelo tamanho dos merozoítos. Os merozoítos de *B. gibsoni* são menores ($\leq 2,5 \mu\text{m}$ de comprimento), e aparecem em forma redonda a oval. Essa espécie de *Babesia* é encontrada na Ásia, América do Norte, Nordeste e Leste da África. (Taboada, Merchand, 1991; Breitschwerdt, 1993). Não há relatos de sua ocorrência no Brasil. Os merozoítos de *B. canis* são maiores ($\geq 2,5 \mu\text{m}$ de comprimento), aparecem em forma de pera e normalmente são encontrados aos pares dentro das hemácias, podendo estar presentes 8 ou mais. Essa é a espécie que tem sido descrita no Brasil, embora sua distribuição geográfica tenha sido primeiramente descrita na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte e América do

Sul (Martinod et al., 1986; Uilemberg et al., 1989).

Os principais transmissores desse protozoário são os carrapatos da família Ixodidae, principalmente *Rhipicephalus sanguineus*, sendo que *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis leachi*, *Hyalomma marginatum* e *Dermacentor andersoni* também têm sido incriminados como vetores de *B. canis* (Ristic, 1988; Taboada & Merchand, 1991; Uilemberg et al., 1989; Breitschwerdt, 1993). Outro mecanismo de transmissão descrito, alternativo ao vetorial, é a via transfusional (Lobetti, 1998).

A infecção dos hospedeiros vertebrados inicia-se quando os carrapatos infectados inoculam esporozoítos de *Babesia* juntamente com a saliva, durante a ingestão de sangue. No cão, os esporozoítos invadem apenas as hemácias e transformam-se em formas arredondadas denominadas trofozoítos. Nesta fase, os trofozoítos sofrem divisões assexuadas (merogonia), produzindo até oito merozoítos por divisão binária. Os merozoítos rompem a célula e imediatamente invadem novas hemácias. Após a penetração na hemácia, o merozoíto transforma-se em trofozoíto, que reinicia novo ciclo. Esses ciclos de divisão assexuada requerem aproximadamente oito horas e continuam indefinidamente até que o hospedeiro estabeleça mecanismos protetores da resposta imune para se recuperar da infecção, ou caso contrário ocorra o óbito.

Após vários ciclos alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos no interior das hemácias. Esta diferenciação pode ocorrer tanto no cão, como no carrapato, logo após a ingestão sangüínea. O carrapato ao sugar sangue de animal infectado ingere as formas parasitárias de trofozoítos, merozoítos e gametócitos. No lúmen intestinal do carrapato os trofozoítos e merozoítos são destruídos e apenas os gametas sobrevivem. Atualmente sabe-se que existe o gameta feminino e o masculino, que se fundem produzindo o zigoto. O zigoto transforma-se em oocinetos que

penetram nas células intestinais do carrapato. Nestas células os oocinetos sofrem o processo de esporogonia, formando células móveis denominadas esporocinetos. Os esporocinetos rompem as células intestinais e caem na hemocele, podendo invadir novas células do vetor, iniciando novos ciclos de esporogonia. Nesta fase o esporocineto multiplica-se em hemócitos, células peritraqeal, células nutritivas do ovário e, menos intensamente, nos tubos de Malpighi, músculos e epiderme. No ovário, os oócitos tornam-se infectados e ocorre a transmissão transovariana da *Babesia*.

As larvas que eclodem dos ovos infectados contêm em suas células intestinais os esporocinetos que ficam dormentes. Com o início da fase parasitária do carrapato e ingestão de nutrientes do hospedeiro, os esporocinetos iniciam novos ciclos de esporogonia. Os parasitos que atingem a glândula salivar vão diferenciar-se em esporozoítos, que é a forma infectante, e serão eliminados na saliva durante a alimentação, iniciando novo ciclo. Todos os estádios do carrapato podem transmitir a *B. canis*, 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 até cinco gerações (Ristic, 1988; Lobetti, 1998).

Há evidências de que isolados de *B. canis* de diferentes regiões geográficas apresentam especificidade de vetores (Lewis et al., 1996), apesar da similaridade morfológica. Uilenberg et al. (1989) observaram que isolados de *B. canis* da França, Norte e Sul da África eram transmitidas pelo *D. reticulatus*, *R. sanguineus* e *H. leachi*, respectivamente. Estes isolados apresentavam testes de reatividade cruzada diferentes, já que as cepas da França e do Norte da África não imunizavam contra a cepa do Sul da África e vice-versa. A cepa do Sul da África, transmitida pelo *H. leachi*, é considerada a mais patogênica. Baseado nisso, foi proposto uma nomenclatura diferenciando três subespécies, ou cepas, de *B. canis*: *B.*

canis canis, transmitida pelo *D. reticulatus*; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *R. sanguineus* e *B. canis rossi*, transmitida pelo *H. leachi*. No Brasil, o carrapato trioxeno *R. sanguineus* é considerado o transmissor da *B. canis* (O'dwyer, 2000).

Existe uma relação direta entre a variação sazonal do vetor e o aparecimento de casos clínicos da doença. Na África do Sul, observa-se maior incidência do vetor, nos meses mais quentes do ano (setembro a abril, com pico em novembro), enquanto na América do Norte a variação sazonal também tem sido descrita, com a maioria dos casos de babesiose canina ocorrendo entre março e outubro (Lobetti, 1998). Cruz-Vazquez (1999) também relatou variação sazonal de *R. sanguineus* no México, onde a maior prevalência do vetor foi observada na primavera, verão e outono. No Brasil há poucos estudos relacionados com a variação sazonal do *R. sanguineus* e com a ocorrência da infecção no país. Como o vetor *R. sanguineus* está adaptado aos grandes centros urbanos, isto implica em alta taxa de infestação dos animais e alta frequência da infecção por *B. canis*, principalmente no verão.

A frequência da infecção foi estudada pela primeira vez no Brasil por Pestana (1910), observando que a doença ocorria quase que exclusivamente em cães novos e que o parasito raramente era detectado fora da fase aguda. Ele também descreveu uma forma grave da doença, na qual observou hemorragias internas, principalmente enterorragias. Paraense & Vianna (1949) examinaram esfregaços sangüíneos de 100 cães de rua, da cidade do Rio de Janeiro, e observaram 14,0% de positividade. Dell'Porto (1986), pesquisou a ocorrência de *B. canis* em 106 cães de rua em São Paulo, relatando que 42,7% foram soropositivos através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e 10,4% apresentavam exame de esfregaço sangüíneo positivos. Ribeiro et al. (1990) examinaram soros de 127 cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, encontrando 66,9% de animais positivos para *B. canis*, através da RIFI. Ao acompanhar animais experimentalmente

inoculados, estes autores relataram parasitemia de até 20% no sangue capilar, enquanto no sangue venoso não passava de 3%. Os animais permaneceram aparentemente normais, exceto por uma elevação da temperatura corporal, que durou dois dias. Os autores sugeriram que Belo Horizonte deva ser uma região endêmica para ocorrência de babesiose canina. Spiewak (1992), na mesma cidade, estudou os aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por *B. canis* em animais atendidos em clínicas e em cães de rua. No primeiro grupo, a autora relatou que a soroprevalência através da RIFI foi de 34,1%, sendo que em 4% dos animais foi detectado o parasito através de esfregaços sangüíneos. No segundo grupo, a soroprevalência foi de 78,4%, confirmando que *B. canis* é endêmica nesta cidade.

Assis (1993), num estudo realizado em São Paulo, inoculou cães não esplenectomizados e esplenectomizados com *B. canis*, para avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos e imunológicos. O autor relatou que a maioria dos animais não apresentou quadro clínico severo de babesiose. Altas parasitemias foram detectadas nos esfregaços sangüíneos nos primeiros dias após a inoculação dos animais. Após isso, a presença de *Babesia* nos esfregaços sangüíneos passou a ser um achado inconstante.

Todos estes estudos constataram que a detecção do parasito através de esfregaços sangüíneos, foi mais eficiente quando se usou sangue capilar do que sangue venoso. Deve-se ressaltar que todos esses trabalhos foram realizados em centros urbanos, onde se observa a presença constante do vetor *R. sanguineus*.

O'Dwyer (2000) estudou a freqüência de *B. canis* em áreas rurais do Rio de Janeiro e constatou que 41,1% foram positivos a RIFI e 5,2% dos cães examinados foram positivos no diagnóstico parasitológico. Foram colhidos carrapatos em 37,6% dos cães examinados, sendo que 23,6% estavam infestados por *Amblyomma cajennense*, 12,4% por *R. sanguineus* e, 2,8% por *A. aureolatum* e 2% por *A. ovale*.

R. sanguineus foi encontrado em quase todas as regiões estudadas, exceto em uma.

Algumas evidências relacionadas com padrão enzimático, imunidade cruzada e sorologia têm sugerido a ocorrência de isolados de *B. canis* com diferenças genéticas e antigênicas (Uilemberg, 1986; Uilemberg et al., 1989). O gene encontrado na pequena unidade ribossomal RNA (ssu-rDNA) tem sido amplamente usado para diagnóstico e diferenciação de espécies de *Babesia* pela "Polimerase Chain Reaction" (PCR) ou pelo método de Southern Blot (Conrad et al., 1992; Persing et al., 1992; Thomford et al., 1994; Olmeda et al., 1997). A comparação das seqüências de ssu-rDNA vem sendo largamente usada nas análises filogenéticas para estudar diferenças entre gêneros e ou entre espécies dentro de um gênero.

Carret et al. (1999) relatam diferenciação em nível molecular das subespécies de *Babesia canis* através da PCR de amplificação de seqüência DNA de *B. canis*. Esta diferenciação molecular tem importância para estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas efetivas contra babesiose canina, uma vez que a proteção cruzada observada entre as subespécies de *B. canis* revela eficácia limitada. Análise da seqüência parcial dos genes (ssu-rDNA) combinadas com diferenças na especificidade de vetores, sorologia e patologia confirmam que as subespécies de *B. canis* podem ser taxonomicamente distintas. A PCR, combinada com a análise do comprimento do fragmento de restrição polimórfico usando enzimas de restrição, confirmou a separação de *B. canis* em três subespécies. Uma aproximação filogenética mostrou que as três subespécies de *B. canis* pertencem ao grupo de espécie de *Babesia sensu strito*, onde *B. canis canis* agrupa com *B. canis rossi*, enquanto *B. canis vogeli* pode formar um grupo monofilético com o agrupamento *B. divergens* e *B. odocoilei*.

No Brasil, região endêmica de ocorrência de babesiose canina, até o presente nenhum critério foi utilizado para verificar a ocorrência de subespécies de *B. canis*. Os

estudos com babesiose em cães, em quase toda sua totalidade, foram realizados em áreas urbanas, limitando nosso conhecimento quanto aos vetores existentes e às diferenças de patogenicidade, restringindo o conhecimento epidemiológico indispensável para traçar medidas de controle dessa enfermidade em nosso meio. Apesar disso, como o único vetor conhecido de *B. canis* descrito no Brasil é o *R. sanguineus*, sugere-se que a nossa amostra seja *Babesia canis vogeli*, que apresenta virulência semelhante a *B. canis canis* (Shaw, 2001).

A fisiopatogenia da babesiose (*B. bovis* e *B. canis*) pode ser comparada à da malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*. A proliferação dos parasitos no organismo desencadeia três processos responsáveis pelo desenvolvimento de sinais clínicos e lesões nos animais: a destruição de hemácias; a liberação de mediadores químicos farmacologicamente ativos, provocando mudanças circulatórias; e, finalmente, o seqüestro de hemácias parasitadas na microcirculação e multiplicação do parasito (Schetters & Montenegro-James, 1995).

A exata seqüência destes eventos ainda não está clara, mas durante a fase aguda da infecção por *B. canis*, os parasitos se proliferam nas hemácias por divisão binária liberando antígenos solúveis que ativam os sistemas de caliceína e o de complemento, resultando na produção de caliceína, bradicinina e outros mediadores, que são potentes vasodilatadores e causam estase sangüínea e hipotensão. A ativação do sistema de coagulação, ao invés de provocar formação de trombos, acarreta uma alteração no metabolismo do fibrinogênio, levando a uma concentração de fibrina que tem afinidade pela superfície das hemácias não infectadas e infectadas na circulação, aumentando a agregação das mesmas. Este fato, associado à hipotensão, acarreta uma diminuição do fluxo sangüíneo, através da microvasculatura e eventualmente estase, favorecendo a adesão da membrana de hemácias com o endotélio. Estes eventos favorecem a proliferação local do parasito nas hemácias,

que é comumente vista em preparações histológicas de órgãos internos (Schetters et al., 1998, Schetters & Eling, 1999).

A agregação de hemácias possibilita a formação de estruturas chamadas rosetas, que ficam presas nos capilares devido ao seu tamanho. Esta proximidade das hemácias faz com que merozoítos passem diretamente de uma célula para outra, facilitando a multiplicação dos parasitos (Wahlgren et al., 1989).

O seqüestro de hemácias parasitadas no interior de capilares e vênulas pós-capilares é consequência direta da adesão da membrana das hemácias parasitadas e da membrana das células endoteliais, devido a modificações estruturais e antigênicas produzidas pelo parasito na superfície das hemácias que se constituem sítios de ligação para receptores expressos em células endoteliais (Pongponratn et al., 1991).

Ao contrário do que se pensava, a anemia manifestada na babesiose não é devida somente à ruptura de hemácias pela saída de merozoítos e pelo aumento da atividade monocítico-fagocitária do baço e do fígado, que ocasiona retirada de hemácias parasitadas da circulação (Mahoney, 1977). Além disso, segundo Schetters et al. (1998), a hipotensão induzida durante a fase aguda da infecção acarreta extravasamento de fluido do interstício para a circulação, o que explicaria os baixos valores de hematócrito e creatinina no plasma. Quedas transitórias do hematócrito podem ser induzidas utilizando-se extratos solúveis de parasitos de *Babesia*, mostrando que as hemácias não são destruídas, mas apenas diluídas no plasma. E mais: em animais infectados com *B. canis*, com anemia acentuada, quando tratados, os valores do hematócrito retornaram ao normal dentro de horas, o que não poderia ser explicado, simplesmente, pela eritropoiese (Schetters & Montenegro-James 1995).

Segundo Schetters et al. (1998), a redistribuição do fluido intersticial pode induzir um aumento da ingestão de água pelo hospedeiro e isto, associado à redução da excreção da urina, pode acarretar um

aumento do peso de um animal infectado em até 20%. Este fato não tem sido observado pelos clínicos veterinários, necessitando de infecção experimental de cães com *B. canis* para comprovação.

A estase sangüínea provocada pelas substâncias vasoativas, e hipotensão e a anemia dificultam o suprimento de oxigênio nos tecidos. A resposta inflamatória é ativada por processos degenerativos e necróticos em consequência da anóxia tecidual, cujos mediadores contribuem para a manifestação de febre e desequilíbrio eletrolítico (Losos, 1986). A anóxia tecidual resultante da obstrução dos vasos, acarreta necrose e liberação local de fatores pró-inflamatórios que induzem a quimiotaxia e diapedese de leucócitos (Wright et al., 1989).

Acúmulo de hemácias parasitadas na microcirculação pode ser observado no cérebro, pulmão, baço, fígado, leptomeninges e lâminas próprias do estômago, intestino delgado e intestino grosso (Breitschwerdt, 1983). O pulmão é um órgão amplamente afetado, podendo apresentar edema e espessamento dos septos alveolares, o que traz sérias alterações respiratórias (Pongponratn et al., 1991).

Reyers et al. (1998) fizeram um estudo retrospectivo de 662 cães atendidos no Onderstepoort Veterinary Academic Hospital (OVAH), com babesiose canina, causada por *B. canis rossi*. Os animais foram divididos em três grupos: severamente anêmicos (SA), cães que apresentavam hematócrito < 15; moderadamente anêmicos (MA), quando apresentavam hematócrito entre 15 a 29 e não anêmicos (NA), aqueles com hematócrito \geq 30. Foram estudados aspectos hematológicos, exames bioquímicos e sinais clínicos dos animais. Os resultados demonstraram que os animais SA exibiram hepatopatia e aumento da uréia no soro, sem um aumento concomitante de creatinina; raramente tinham distúrbios eletrolíticos, e apresentavam severa leucocitose. Ao contrário, os cães NA, exibiram severa azotemia, marcado distúrbio eletrolítico e

suave resposta leucocitária, sendo que alguns deles apresentaram leucopenia, com linfocitopenia. Estes resultados indicam que a severidade da anemia está relacionada com a doença hemolítica, possivelmente imunomediada. Cães NA desenvolveram uma aguda e profunda resposta inflamatória. A anemia foi mais severa em animais jovens. Foi observado que animais das raças Bull terries, Pit bull e Staffordshirebull terries, provavelmente possuem uma predisposição genética para desenvolver uma resposta inflamatória aguda mediada por citocinas, pois nenhum animal sobreviveu à infecção.

Tem sido observado que a fisiopatogenia do parasito varia de acordo com cepa de *B. canis*. Pages et al. (1990) relataram que em 133 cães infectados com isolados da França, foi constatada apenas leve anemia e trombocitopenia. Carlos et al. (1989), ao estudarem 291 casos de babesiose canina em cães nas Filipinas, relataram uma suave anemia como única alteração observada e classificaram esta manifestação clínica como crônica ou subclínica.

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de cães com babesiose permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica, em ordem decrescente de gravidade (Abdullahi et al., 1990). A fase aguda apresenta sinais clínicos variados, podendo passar despercebida. É caracterizada por parasitemia considerável, provavelmente devido a intensa multiplicação do parasito e ausência de mecanismos protetores da resposta imune do hospedeiro vertebrado já instalados. As manifestações mais freqüentes consistem em febre, enfartamento ganglionar, anorexia, depressão, fraqueza, letargia, anemia, icterícia, hemoglobinúria, esplenomegalia (Spiewak, 1992). Esta fase pode apresentar uma forma hiperaguda com sinais clínicos variados e geralmente leva o animal à morte.

A evolução da fase aguda para a crônica, embora ainda não totalmente esclarecida, é acompanhada pela diminuição do parasitismo. Os animais portadores da infecção crônica por *B. canis* podem

apresentar diferentes manifestações clínicas. Acredita-se que estas manifestações distintas são consequência de mecanismos multifatoriais que envolvem tanto aspectos do parasito, quanto aspectos do hospedeiro vertebrado, salientando a complexidade da interação parasito-hospedeiro. Dentre os fatores relacionados ao parasito, a variabilidade entre cepas, a virulência, a antigenicidade e a intensidade de parasitemia são apontados como os aspectos de maior relevância nesse processo (Martinod et al., 1986; Macwilliams, 1987; Uilemberg et al., 1989; Schetters et al., 1997). Em relação ao hospedeiro vertebrado, a idade e o perfil da resposta imune parecem ser os principais elementos que desencadeiam diferenças individuais, bem como o desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas da infecção por *B. canis*. Os cães jovens são os mais sensíveis e freqüentemente apresentam formas mais graves da doença (Farwell, 1982; Breitschwerdt, 1983, Bobade et al., 1989; Ribeiro et al., 1990). Esta fase pode apresentar uma forma subclínica com sinais clínicos distintos.

Alguns autores sustentam que a idade do animal não tem influência na susceptibilidade à babesiose canina (Nair et al., 1979; Martinod et al., 1986). Em relação ao sexo, Nair et al. (1979); Martinod et al. (1986); Bobade et al. (1989); Ribeiro et al. (1990) e Spiewak, (1992), que estudaram a prevalência de babesiose canina, não observaram diferença entre machos e fêmeas. Dell'Porto (1986) relatou maior freqüência de fêmeas positivas através da RIFI, atribuindo ao fato de as fêmeas serem mais sedentárias, principalmente no período pós parto, estando mais sujeitas a infestações pelo vetor da doença.

Do ponto de vista clínico, a babesiose canina pode ser classificada em clássica ou associada. Sinais típicos de babesiose clássica estão relacionados com a fase aguda da infecção, quando os animais podem apresentar hemólise aguda, febre, anorexia, depressão, mucosas pálidas e esplenomegalia. A babesiose clássica ainda pode ser assintomática, moderada ou severa, dependendo do grau da anemia.

Animais com infecção assintomática podem progredir para doença grave e o hematócrito pode apresentar quedas bruscas (< 5%), levando inclusive o animal à morte.

Os sinais clínicos de babesiose associada não envolvem anemia hemolítica e estão relacionados com a fase hiperaguda e crônica da infecção. As complicações mais comuns são falência renal aguda, babesiose cerebral, coagulopatia, hepatopatia e icterícia, anemia hemolítica imuno-mediada, síndrome respiratória aguda, hemoconcentração e choque. Complicações raras incluem distúrbios respiratórios, mialgia, comprometimento ocular, comprometimento cardíaco, necrose de extremidades, sendo que diferentes complicações podem ocorrer ao mesmo tempo (Breitschwerdt, 1983; Lobetti, 1998).

Em relação ao diagnóstico da babesiose canina, podemos observar dois momentos distintos: o diagnóstico clínico e o laboratorial. No que se refere ao diagnóstico clínico, alguns autores têm relacionado a ocorrência de sinais clínicos e/ou patologias apresentadas por cães com babesiose. Spiewak (1992) relatou que existe correlação entre cães com neoplasia e com a forma crônica da babesiose, sugerindo que a imunossupressão sofrida pelo animal permitiria a multiplicação do parasito. Abdullahi (1990) diagnosticou 70 casos de babesiose canina causada por *B. canis*, na Nigéria. Os sinais mais comuns relacionados a todas as formas da doença foram anorexia e letargia, sendo que febre, mucosas pálidas, linfadenopatia e esplenomegalia também foram freqüentes. De forma contrária, Dell'Porto (1986) relatou que sinais clínicos de febre e mucosas pálidas não constituem elementos seguros que possam auxiliar no diagnóstico de babesiose crônica.

As principais dificuldades relacionadas ao diagnóstico clínico estão associadas às diferentes formas de manifestação clínica da infecção. Dessa forma, os sinais clínicos, a hematologia e a anamnese são de valor para o diagnóstico de babesiose para muitos clínicos veterinários, mas são inconstantes, donde se conclui que o

diagnóstico definitivo não pode ser puramente clínico (Meynard & Goudichaud, 1974).

Além disso, apesar dessa enfermidade possuir tratamentos eficazes e exeqüíveis, muitas vezes o diagnóstico diferencial com outras enfermidades (leptospirose, erlichiose, anemia, cinomose e hepatite), que apresentam sinais clínicos similares não é possível, principalmente nos casos agudos. Os animais são tratados com quimioterápicos e/ou drogas variadas, sendo que muito deles chegam a óbito por falta de tratamento adequado.

No que se refere ao diagnóstico laboratorial a técnica de esfregaço sangüíneo, apesar da simplicidade de execução e da boa especificidade, é pouco sensível (Breitschwerdt, 1983). A detecção do parasito nos casos atípicos e crônicos, onde a presença do parasito é escassa, torna-se difícil através deste método (Anderson, 1980; Breitschwerdt, 1983; Levy et al., 1987; Wlosniewsk et al., 1997). Nessa situação, a positividade ocorre nos casos agudos, onde há parasitemia elevada, como ocorre com *B. canis rossi*, que apresenta alta patogenicidade e parasitemia, ao contrário de *B. canis canis* e *B. canis vogeli*.

Ainda com relação ao diagnóstico laboratorial, vários testes sorológicos são empregados para detecção de anticorpos anti-*Babesia*, sendo a RIFI o mais utilizado tanto para *B. canis* (Levy et al., 1987; Ribeiro et al., 1990; Taboada et al., 1992; Vercammen et al., 1995.), como para outras espécies de *Babesia* (Anderson et al., 1980; Linhares et al., 1992; Yamane et al., 1993). Embora a RIFI seja um teste bastante sensível durante a fase crônica da infecção na detecção de anticorpos anti *B. canis* (Ristic et al., 1988), o seu uso não é indicado na fase aguda da infecção, uma vez que cães infectados com *B. canis* apresentam soroconversão tardia (17 a 42 dias após a infecção) (Ristic et al., 1988; Assis, 1993; Vercammen et al., 1995). Filhotes parasitêmicos ou que estavam durante a fase hemolítica da infecção com *B. canis* podem apresentar resultados falso-negativos através da RIFI (Farwell, 1982,

Breitschwerdt et al., 1983; Bobade et al., 1989). Segundo os autores, a razão pela qual animais clinicamente infectados ainda não produziram anticorpos contra o parasito não está muito clara, tendo em vista a complexidade da relação parasito hospedeiro, especialmente em infecções naturais. Provavelmente, cães que foram infectados pela primeira vez necessitam de um período latente para a produção de anticorpos contra o parasito. As reações sorológicas refletem a multiplicação do parasito no hospedeiro, mas a detecção do parasito pode não coincidir com a detecção de anticorpos (Ristic, 1988).

Outra limitação apresentada por este método está relacionada ao fato de não identificar infecção ativa. A persistência de altos títulos de RIFI é observada nos hospedeiros de áreas endêmicas para *B. canis*, que mantêm infecção subclínica (Bobade, 1989). Neste caso a RIFI seria recomendável para inquéritos epidemiológicos.

Como método auxiliar no diagnóstico laboratorial, o hematócrito têm sido usado rotineiramente como triagem dos animais com suspeita clínica de babesiose, uma vez que resultados < 30 sugestivos de anemia, são freqüentemente associados a hemoparasitoses (Reyers et al. 1998).

Considerando assim, as limitações e desafios do diagnóstico da babesiose canina, o advento da citometria de fluxo têm trazido novas perspectivas no diagnóstico laboratorial. Estudos recentes com Malaria e *Babesia*, utilizando esta metodologia como novo método de análise de hemácias parasitadas, para identificação e acompanhamento dos estágios de desenvolvimento e susceptibilidade a drogas destes hemoparasitos, têm mostrado resultados promissores. Assim como ocorre no ciclo biológico de *B. canis*, uma parte do ciclo biológico do *Plasmodium* sp. se dá na circulação sangüínea do hospedeiro, onde o parasito invade hemácias nas quais ele cresce e se multiplica. A demonstração do parasito em esfregaços sangüíneos é usada como diagnóstico, mas muitas vezes isto não é possível.

A citometria de fluxo, é uma metodologia de análise celular automatizada, que através da análise da dispersão do raio laser, permite a avaliação simultânea de aspectos relacionados à morfologia celular e emissão de fluorescência de uma célula suspensa em meio líquido. Nos casos da malária e babesiose, a fluorescência emitida é devida as hemácias infectadas com o parasito.

O raio laser atinge as células individualmente, o que ocasiona ocorrência de dois fenômenos físicos: dispersão da luz, devido aos aspectos morfológicos e estruturais das células e emissão de fluorescência, quando esta é marcada com um fluoróculo. A caracterização fenotípica por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser-“Sider Scatter”-SSC, e intensidade relativa de fluorescência (FL1, FL2 e FL3). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema ótico eletrônico acoplado que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula, hidrodinamicamente focalizada. Estes sinais óticos e elétricos podem ser medidos e armazenados para posterior análise em um computador associado ao citômetro de fluxo, através de software específico. O estudo de diferentes componentes ou elementos celulares podem ser realizados simultaneamente, empregando-se fluoróculos diferentes (Jaroszeski & Radcliff, 1999).

Esta metodologia tem mostrado ser rápida, sensível e com boa aplicabilidade e reprodutibilidade nos testes interlaboratoriais (Janse & Vianem, 1994) para identificação de espécies de *Plasmodium*.

Alguns aspectos relacionados ao princípio da detecção de hemoparasitos por citometria de fluxo são altamente relevantes. Janse & Vianem (1994) propuseram a detecção de hemácias infectadas com *Plasmodium* sp, utilizando marcadores

específicos para ácidos nucléicos, como Iodeto de Propídeo e Hoechst 33258, para identificação do parasito, considerando que as hemácias são anucleadas e não possuem DNA, permitindo assim, identificar células não infectadas de infectadas, bem como acompanhar os diferentes estágios de desenvolvimento e susceptibilidade a drogas do parasito.

Roward & Rodwell (1979) também analisaram, através da citometria de fluxo, amostras sangüíneas infectadas com *Babesia* sp. utilizando o marcador específico para ácidos nucléicos, Hoechst 33258. Os autores relataram que hemácias parasitadas puderam ser separadas de hemácias não parasitadas através desta técnica.

Entretanto, a fluorescência detectada poderia não ser exclusiva do parasito, porque, segundo Mons & Janse (1992), reticulócitos que são freqüentes em processos anêmicos, possuem RNA, o que levaria a resultados falso negativo, dificultando a discriminação entre células infectadas e não infectadas.

Na tentativa de contornar este problema, trabalhos relatam a aplicabilidade da hidroetidina, marcador específico de DNA, na detecção de *Babesia* sp., por citometria de fluxo. Wyatt et al. (1991) e Davis et al. (1992) detectaram hemácias infectadas com *B. bovis* após usar este marcador, distinguindo células infectadas, que apresentavam parasitos viáveis, daquelas sem parasitos ou com parasitos mortos. Fukata et al. (1996) também pesquisaram, através da citometria de fluxo, hemácias parasitadas com *B. gibsoni* em amostras sangüíneas de cães infectados, utilizando hidroetidina. As 26 amostras analisadas revelaram um coeficiente de relação de 0.97% de parasitemia em comparação com o método de microscopia de luz. Os autores não detectaram reticulócitos através desta técnica.

A hidroetidina é um composto que permite a marcação específica de DNA. Entretanto requer metabolização prévia e conversão em brometo de etídeo, que é um fluorocromo que se liga ao DNA do parasito,

podendo ser excitado por laser e emitir fluorescência. Dessa forma, este composto comporta-se como marcador vital, sendo incorporado apenas por células contendo parasitos vivos Gallop et al. (1984).

Já o Iodeto de propídeo é um marcador específico de ácidos nucléicos, permitindo a marcação de DNA e RNA. Para os estudos de citometria de fluxo, este marcador requer permeabilização celular (fixação de hemácias em glutaraldeído), não se comportando como corante vital. Além do mais, pode identificar reticulócitos pela habilidade de se ligar ao RNA Saul et al. (1982), Pattanapanyasat et al. (1992).

Com relação à fixação de hemácias com glutaraldeído, Crissmann et al. (1979) relataram que esta é uma técnica rápida e segura e que este composto não induz aglutinação ou lise das células, fato comumente observado em amostras fixadas com metanol e etanol. Porém, glutaraldeído e paraformaldeído podem causar reação cruzada com componentes da membrana celular, impedindo a penetração de moléculas de alto peso molecular, como anticorpos monoclonais, marcadores de DNA ou grandes fluorocromos. Além disso, estes fixadores reduzem significativamente o efeito da emissão de fluorescência de certos fluorocromos ligados a DNA.

Numa última abordagem, Uemura et al. (1990) analisaram amostras de sangue periférico de cães infectados com *Babesia gibsoni* por citometria de fluxo e avaliaram a porcentagem de reticulócitos, utilizando tiazole orange, corante de ácidos nucléicos. Os autores não conseguiram identificar hemácias parasitadas com *B. gibsoni* e postularam que este parasito seja muito pequeno para emitir fluorescência detectável por esta técnica ou, então, seja pobremente marcado por tiazole orange, quando comparado com espécies de Plasmodium.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização do experimento:

O projeto foi executado no Laboratório de Protozooses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG; no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e nos Laboratórios de Doenças de Chagas e Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ).

4.2. População de cães estudada

Neste estudo foram utilizados 183 animais, machos e fêmeas, sendo:

- 10 cães adultos, sem raça definida (SRD), com idade variada, oriundos do Centro de Zoonoses de Belo Horizonte, que foram esplenectomizados para o isolamento da amostra de *B. canis* de Belo Horizonte.
- 11 filhotes, SRD, que foram criados em ambiente livre de carrapatos desde o nascimento, e mantidos em canis apropriados, com ração comercial e água a vontade. Esses animais foram banhados com produtos carrapaticidas (deltametrina e amitraz) de 14 em 14 dias, com o objetivo de se evitar infestação com o carrapato vetor *R. sanguineus*. Aos quatro meses de idade, após confirmação de sorologia negativa para *B. canis*, pela técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), quatro animais foram esplenectomizados, para realização da infecção experimental com *B. canis* e sete animais foram mantidos como controle negativo.
- 162 amostras sangüíneas foram colhidas, com anticoagulante, de cães de raças e idades variadas, atendidos em três clínicas veterinárias de Belo Horizonte: Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, Veterinária Santo Agostinho e Kriar Veterinária. A colheita foi realizada no período de março a setembro de 2000, tanto de animais levados às clínicas para consulta, quanto de animais saudáveis levados para vacinação e

cirurgia estética. O tamanho da amostra foi calculado a partir da frequência de anticorpos anti-*B. canis* encontrada em cães de clínicas de Belo Horizonte (Spiewak, 1992), utilizando-se a seguinte fórmula: $n = p(100-p)z^2/(p.d)^2$, onde: n = tamanho da amostra, p = prevalência esperada, z = grau de confiança (95% = 1,96) e d = margem de erro esperada = 0,2, obtendo-se um n = 144. Para maior segurança, esse número foi acrescido de 12%, passando para 162 animais. Procurou-se obter de cada animal, informações sobre a forma de criação (casa ou apartamento), histórico de infestação por carrapatos, frequência de banhos carrapaticidas, sintomas e diagnóstico clínico (cães doentes) ou motivo de atendimento (cães saudáveis), além da identificação (raça, sexo, idade e número de entrada na ficha do arquivo da clínica). Esses dados foram obtidos durante a anamnese realizada pelo veterinário responsável pelo caso e/ou através da ficha clínica. Os dados foram registrados em fichas numeradas individuais (Anexo). A escolha dos sintomas clínicos baseou-se na sintomatologia observada na babesiose clínica, segundo a literatura consultada. As amostras sangüíneas foram mantidas em geladeira, a 4°C, até o momento de serem processadas no laboratório.

4.3. Amostras de *Babesia canis* utilizadas

Dez cães adultos foram esplenectomizados e acompanhados diariamente, durante 12 dias, através de esfregaços sangüíneos com amostras de sangue venoso e capilar. Os esfregaços sangüíneos foram fixados e corados pelo método de Panótico* e, depois de secas, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (aumento de 1000X), contando-se 40 campos microscópicos em cada esfregaço. Quando um dos cães apresentou parasitemia patente de *B. canis* de 0,25% no sangue venoso e hematócrito de 30 ($1,875 \times 10^7$ hemácias parasitadas/ml), foram colhidos 20 ml de

sangue da veia jugular, com seringa e agulha estéril, transferidos para tubos estéreis com anticoagulante (EDTA), homogeneizado e armazenados na geladeira a 4°C.

Outra amostra de *B. canis*, foi obtida de um cão esplenectomizado, oriundo do Município de Lavras, Minas Gerais. O sangue foi mantido a 4°C, como descrito anteriormente.

Dos quatro filhotes esplenectomizados, criados em ambiente livre de carrapatos, três foram inoculados, por via endovenosa, com $1,875 \times 10^7$ hemácias parasitadas da amostra de BH e um cão foi inoculado com a amostra oriunda de Lavras, na mesma quantidade. Os quatro animais e um cão do grupo controle negativo foram acompanhados diariamente, através de esfregaço sangüíneo capilar, sendo colhido, também, 1,0 ml sangue com anticoagulante, através de punção das veias radial ou jugular. O sangue com anticoagulante foi utilizado para confecção de esfregaço sangüíneo venoso, determinação do índice hematimétrico, através da técnica de microhematócrito e para análise por citometria de fluxo. As amostras sangüíneas foram mantidas em geladeira, a 4°C, por no máximo 48 horas, até o momento do processamento no laboratório.

4.4. Padronização da técnica de citometria de fluxo para detecção de hemácias parasitadas com *B. canis*

4.4.1. Fixação de hemácias

Para determinar o método de fixação de hemácias a ser utilizado no estudo por citometria de fluxo foram testados os fixadores: Acetona (2,5, 5 e 10%), Formaldeído (0,5 e 1,0%), Glutaraldeído (0,25%), Metanol (70%) e Paraformaldeído (1%). Os fixadores foram diluídos em PBS (0,015 M) e testados com:

- Suspensão de sangue total: sangue colhido do cão com anticoagulante e mantido em geladeira. Foi adicionado 75µl de sangue em 5 ml de fixador.

* Laborclin

- Suspensão de papa de hemácias: o sangue com anticoagulante foi centrifugado a 352 g durante 5 minutos. O plasma foi removido e 25 µl da papa de hemácias foram adicionados em 5 ml de fixador.
- Suspensão de papa de hemácias lavadas: o sangue foi centrifugado a 352 g, por 5 minutos e o plasma removido. A papa de hemácias foi ressuspendida em PBS ou solução salina, pH 7,3, e lavada duas vezes por centrifugação (352 g, 10 min., temperatura ambiente). Foram utilizados 25 µl de papa de hemácias em 5 ml de PBS.

As soluções foram incubadas em geladeira a 4°C, por 15 minutos ou 12 horas, sendo os resultados avaliados em seguida (Tabela 1).

Tabela 1. Fixação de hemácias.

Fixador/Concentração	Tempo de Fixação
Acetona 2,5, 5 e 10%	15 min
Formaldeído 0,5 e 1,0%	15 min
Glutaraldeído 0,25%	15 min
Glutaraldeído 0,25%	12 h
Glutaraldeído 0,25%	Hemácias mantidas em solução
Metanol 70%	15 min
Paraformaldeído 1%	15 min

4.4.2. Sistemas marcadores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo

Iodeto de Propídeo (PI)

Uma solução estoque de Iodeto de Propídeo (Sigma) foi preparada com PBS a 20 mg/ml e mantida na geladeira a 4°C, ao abrigo da luz. A solução de trabalho foi preparada no dia do uso, diluindo-se a solução estoque em PBS, de forma a se

obter seis concentrações: 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/ml.

Hidroetidina (HE)

Uma solução estoque de Hidroetidina (Polysciences, Warrington, Pennsylvania) foi preparada com Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) a 10 mg/ml, sendo conservada em geladeira. A solução de trabalho foi preparada no dia do uso, diluindo-se 10 µl da solução de estoque em 2,0 ml de PBS. Esta solução foi centrifugada a 30678 g durante 5 minutos, sendo utilizado o sobrenadante. Três concentrações de HE foram testadas: 12,5 µg/ml, 25,0 µg/ml e 50 µg/ml.

4. 4.3. Estudo de hemácias parasitadas marcadas com PI

Os ensaios de marcação de hemácias parasitadas com PI foram realizados em placas de poliestileno de 96 poços com fundo em U (Nunc, Denmark), utilizando-se diferentes concentrações de PI e tempo de incubação (Tabela 2). Foram realizados experimentos utilizando-se 25 µl de suspensão de sangue total fixado em glutaraldeído e suspensão de papa de hemácias lavadas e fixadas em glutaraldeído. As células foram incubadas com PI, em estufa bacteriológica a 37°C, por 30 minutos ou uma hora, ou em geladeira a 4°C, por 12 horas, todas ao abrigo da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (626 g por 7 minutos a temperatura ambiente) e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram ressuspendidos em 200 µl de PBS, transferidos para tubos de 1 ml e a leitura realizada imediatamente no citômetro de fluxo (FacsCalibur-Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os dados coletados foram armazenados em *zip disks* para posterior análise.

Tabela 2. Marcação com Iodeto de Propídeo (PI) de hemácias parasitadas com *B. canis* e fixadas em Glutaraldeído 0,25%.

Concentração PI µg/ml	Tempo de incubação	Temperatura (°C)	Suspensão de sangue total fixado em GA	Suspensão de papa de hm lavadas, fixadas em GA
5	30 min	37	X	
10	30 min	37	X	
25	30 min	37	X	
50	30 min	37	X	
5	<i>overnight</i>	4	X	
10	<i>overnight</i>	4	X	
25	<i>overnight</i>	4	X	
50	<i>overnight</i>	4	X	
25	1 h	37	X	X
50	1 h	37	X	X
100	1 h	37	X	X
200	1 h	37	X	X

4.4.4. Estudo de hemácias parasitadas marcadas com HE

Os ensaios de marcação de hemácias parasitadas com HE foram realizados segundo protocolo descrito por Fukatta et al. (1999) e adaptado para placas de 96 poços com fundo em U. Foram testadas suspensões de hemácias com sangue total e com papa de hemácias lavadas com PBS. Uma suspensão de hemácias de 50 µl foi adicionada em 150µl de solução de HE nas concentrações de 12,5; 25,0 e 50,0µg/ml e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 20 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente foram centrifugadas (626 g, por 7 minutos a temperatura ambiente) e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em 300 µl de PBS, transferidos para tubos de 1 ml e a leitura realizada imediatamente no citômetro de fluxo. Os dados coletados foram armazenados em *zip disks* para posterior análise.

Amostras sanguíneas parasitadas com *B. canis*, mantidas resfriadas a 4° C por três, 24 ou 48 horas depois de colhidas, foram submetidas a marcação com HE e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram comparados com marcação de hemácias parasitadas recém colhidas, consideradas como controle.

Neste estudo, melhores resultados foram obtidos nos ensaios em que se utilizou hemácias parasitadas marcadas com HE, conforme o seguinte protocolo: 50 µl de suspensão de hemácias, preparada com sangue previamente lavado com PBS e incubadas com 150 µl HE a 25 µg/ml. Este procedimento foi adotado em todas as etapas seguintes de marcação de hemácias e análise por citometria de fluxo

4.4.5. Obtenção dos dados de citometria de fluxo

Os dados de citometria de fluxo foram obtidos utilizando-se o programa CellQuest (Becton Dickinson). Foram analisadas 30 mil células para cada amostra. A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema ótico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios laser incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (*FSC-Foward Scatter*), granulosidade ou complexidade interna (*SSC-Side Scatter*) e a emissão de fluorescência. Neste estudo foram empregadas hemácias marcadas com PI ou HE que, quando excitadas, emitiam sinais luminosos distintos, correspondentes a fluorescência do tipo 2 (FL2). A análise das hemácias foi inicialmente feita pela seleção

da população celular de interesse (Figura 1A). Hemácias apresentam uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho *versus* granulosidade, o que permite o posicionamento de um marcador (janela) sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Utilizando-se gráficos de distribuição puntual de fluorescência em função do número de hemácias, pode-se analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelas hemácias após incubação com PI ou HE, de cães não infectados e de cães infectados com *B. canis*, foram expressos em percentual de

hemácias fluorescentes positivas (PHFP) no quadrante superior direito de cada gráfico, observados para cada teste individual.

O PHFP foi determinado para cada amostra, através do estabelecimento de um limiar de negatividade que permitia a separação dos agrupamentos de hemácias positivas e negativas em função da intensidade de fluorescência, onde foi posicionado um marcador (Figura 1C). Para cada conjunto de ensaios foi realizado um controle sem adição de HE, denominado controle do PBS. Para fins de controle de qualidade, após o posicionamento do marcador, seguia-se o critério de se obter um valor de PHFP $\leq 0,9\%$ (Figura 1B).

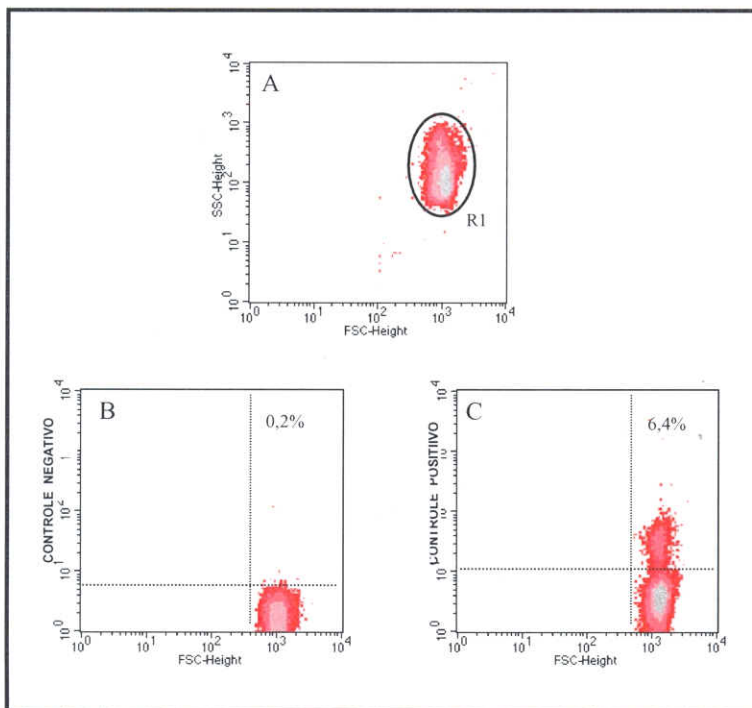


Figura 1. Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Seleção da população de hemácias (A), utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Gráficos de fluorescência, representando o percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP), após incubação com um controle negativo(B) e com um controle positivo(C).

4.4.6 Limiar de reatividade

Foram utilizados os sete cães mantidos como controle negativo e criados em ambiente livre de carrapatos desde o nascimento, os quais apresentaram exames negativos de esfregaço sangüíneo e RIFI. Amostras sangüíneas dos animais foram analisadas por citometria de fluxo para obtenção dos dados de PHFP. Com base nos resultados obtidos, foram calculados a média e o desvio padrão.

4.5. Estudo longitudinal de cães inoculados experimentalmente com *B. canis* por citometria de fluxo

Dois cães inoculados com hemácias parasitadas com *B. canis* foram acompanhados por citometria de fluxo. Um cão foi inoculado com a amostra de *B. canis*, isolada em Belo Horizonte, e diariamente foi feita punção capilar e coletado 1,0ml de sangue com anticoagulante durante 38 dias após inoculação. Posteriormente, a punção capilar e a coleta sangüínea foi realizada com intervalos de dois dias até o 98º dia e com intervalos variados até o 195º dia (28 semanas), quando o experimento foi encerrado. O outro cão foi inoculado com a amostra isolada de Lavras e a coleta foi realizada diariamente, durante 21 dias. Um cão não infectado foi mantido como controle negativo. As amostras sangüíneas foram analisadas através de esfregaços sangüíneos capilar e venoso, hematócrito e por citometria de fluxo, sendo o plasma congelado para realização de reações sorológicas.

4.6. Emprego da citometria de fluxo no diagnóstico de *B. canis* nas clínicas veterinárias

As 162 amostras sangüíneas de cães, obtidas nas três clínicas veterinárias de Belo Horizonte, foram analisadas através de esfregaço sangüíneo venoso e hematócrito. Depois foram centrifugadas e o plasma congelado para pesquisa de anticorpos anti-*B. canis*.

As hemácias foram analisadas por citometria de fluxo e os resultados armazenados em *zip disks* para posterior análise e obtenção dos dados de PHFP.

4.7. Pesquisa de anticorpos anti-*B. canis*

Foram utilizadas amostras de soros dos cães de rua, dos cães criados em ambiente livre de carrapatos, dos animais inoculados experimentalmente e dos 162 cães atendidos em clínicas veterinárias. O soro foi alíquotado e estocado a -20°C até sua utilização. No momento do uso, as amostras foram descongeladas e diluídas ao dobro de 1:40 até 1:2.560 em PBS. A pesquisa de anticorpos para *B. canis* foi feita através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), de acordo com o IICA (1987). O antígeno para detecção de anticorpos anti-*B. canis* foi preparado segundo a técnica descrita por Ribeiro et al. (1990). Utilizou-se globulina de coelho anti-cão conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Fundação Biomanguinhos), conservada a 4°C, título 1:160.

4.8. Análise estatística

Os dados referentes ao estudo foram tabulados e as diferenças estatisticamente significativas foram identificadas pelo teste de Qui-quadrado e pelo teste de Fischer, utilizando-se o nível de significância de 95%.

5 RESULTADOS

5.1. Comportamento das amostras de *B. canis*

Para o isolamento da amostra de *B. canis* de Belo Horizonte, dos 10 cães adultos esplenectomizados, cinco (50,0%) apresentaram parasitemia detectável nos esfregaços sangüíneos entre dois e nove dias ($\bar{X} = 5,50\% \pm 3,50$) após a cirurgia. A amplitude da parasitemia foi significativamente maior ($p < 0,05$) no sangue capilar, variando de 0,01 a 0,47% ($\bar{X} = 0,14\% \pm 0,19$), do que no sangue venoso, que variou de 0,01 a 0,34%.

($\bar{x} = 0,09\% \pm 0,11$). A amplitude do pico de parasitemia variou de 0,07 a 0,47% ($\bar{x} = 0,26\% \pm 0,20$) no sangue capilar e de 0,02 a 0,34% ($\bar{x} = 0,14\% \pm 0,13$) no sangue venoso, sendo detectadas parasitemias muito baixas (0,01%) após o aparecimento

do pico. Dentro dos parâmetros observados, os cães permaneceram clinicamente normais. A figura 2 mostra hemácias de sangue capilar, parasitadas com *B. canis*, de um cão inoculado experimentalmente.

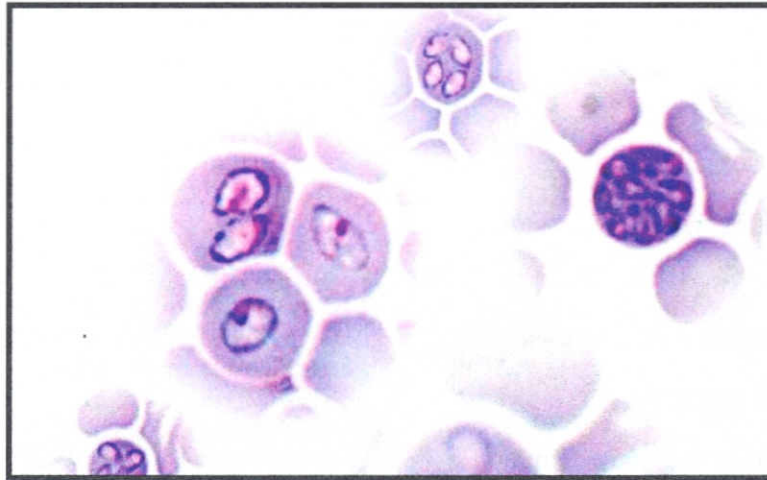


Figura 2. Hemácias de cão parasitadas com *Babesia canis*. (Aumento de 1000 x). Giemsa.

Na Tabela 3 encontram-se os dados referentes à infecção experimental dos quatro animais esplenectomizados e inoculados com as amostras de *B. canis* isoladas nos municípios de Belo Horizonte e Lavras.

Em todos os animais inoculados, em ambas as amostras, as primeiras hemácias foram detectadas nos esfregacos sangüíneos, entre dois a três dias ($\bar{x} = 2,5 \pm 0,50$) pós-inoculação, sendo observado um pico de parasitemia no terceiro. Este pico foi reduzido drasticamente a partir do quarto dia, quando a parasitemia passou a ser detectada em níveis muito baixos (em torno de 0,01%), durante o período de acompanhamento dos animais. A presença de *Babesia* passou a ser um achado

inconstante nos esfregaços sangüíneos, com eventuais períodos de ausência e pequenas elevações periódicas da parasitemia, que não obedeceram a um padrão de comportamento. A redução do HT foi detectada no início da parasitemia, sendo observado, em todos os animais um decréscimo significativo no quinto dia pós-inoculação. A maioria dos animais não apresentou sinais clínicos de babesiose, exceto um cão inoculado com amostra de *B. canis* de Belo Horizonte, que apresentou fraqueza, hemoglobinúria, palidez de mucosas e aumento exponencial da parasitemia a partir do 21º dia pós-inoculação. No 24º dia, o animal foi tratado com 3mg/kg de Imidocarb (Coopers), recebeu sangue transfundido e foi retirado do experimento.

Tabela 3. Infecção experimental de cães com *Babesia canis* isoladas em Belo Horizonte e Lavras, 2000.

Características	Amostra Belo Horizonte (n=3)	Amostra Lavras (n=1)	
Duração da parasitemia patente (dias)	16 a 22 ($\bar{x} = 18,33 \pm 2,62$)	16	
Amplitude da parasitemia	Sangue capilar	0,01 a 15,07% ($\bar{x} = 9,12 \pm 6,34$)	0,01 a 1,40% ($\bar{x} = 0,22 \pm 0,38$)
	Sangue venoso	0,01 a 4,70% ($\bar{x} = 1,04 \pm 1,70$)	0,01 a 1,28% ($\bar{x} = 0,15 \pm 0,33$)
Valores mínimos de Hematócrito	13 a 16% ($\bar{x} = 14,5 \pm 1,5$)	19%	
No de animais com sinais clínicos	1	-	

5.2. Padronização da técnica de citometria de fluxo para detecção de hemácias parasitadas com *B. canis*

5.2.1. Fixação de hemácias

Foi verificado que o glutaraldeído possui melhor capacidade de fixação por não causar hemólise. Quando foram utilizados os outros fixadores, constatou-se a ocorrência de lise ou aglutinação das hemácias. O exame das hemácias fixadas com glutaraldeído apresentou melhor leitura no citômetro quando elas foram previamente lavadas com PBS. O tempo de fixação das hemácias com glutaraldeído por 15 minutos ou 12 horas não apresentou diferença na leitura, sendo adotado o período de 15 minutos nas etapas posteriores.

5.2.2. Sistemas marcadores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo

Iodeto de propídeo (PI)

Os ensaios conduzidos por citometria de fluxo revelaram que foi possível a detecção de hemácias parasitadas com *B. canis* marcadas com PI. Melhores resultados de PHFP foram obtidos nos experimentos conduzidos com hemácias fixadas em glutaraldeído 0,25%, por 15 minutos e incubadas a 37°C por uma hora, com concentrações crescentes de PI de 25 a 200µg/ml, com suspensão de sangue total (Figuras 2, 3) e com suspensão de papa de hemácias lavadas (Figuras 4 e 5). Foi observado que a PHFP foi diretamente proporcional à concentração de PI e que melhores resultados foram obtidos utilizando-se suspensão de sangue total (Figura 3), quando comparado com a incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas (Figura 5). Em um dos cães inoculados experimentalmente, a maior PHFP observada foi de 5,41% (Figura 3-F) e a parasitemia detectada nesta ocasião, através de esfregaco sangüíneo, foi de 18,60% no sangue capilar e de 1,07% no sangue venoso.

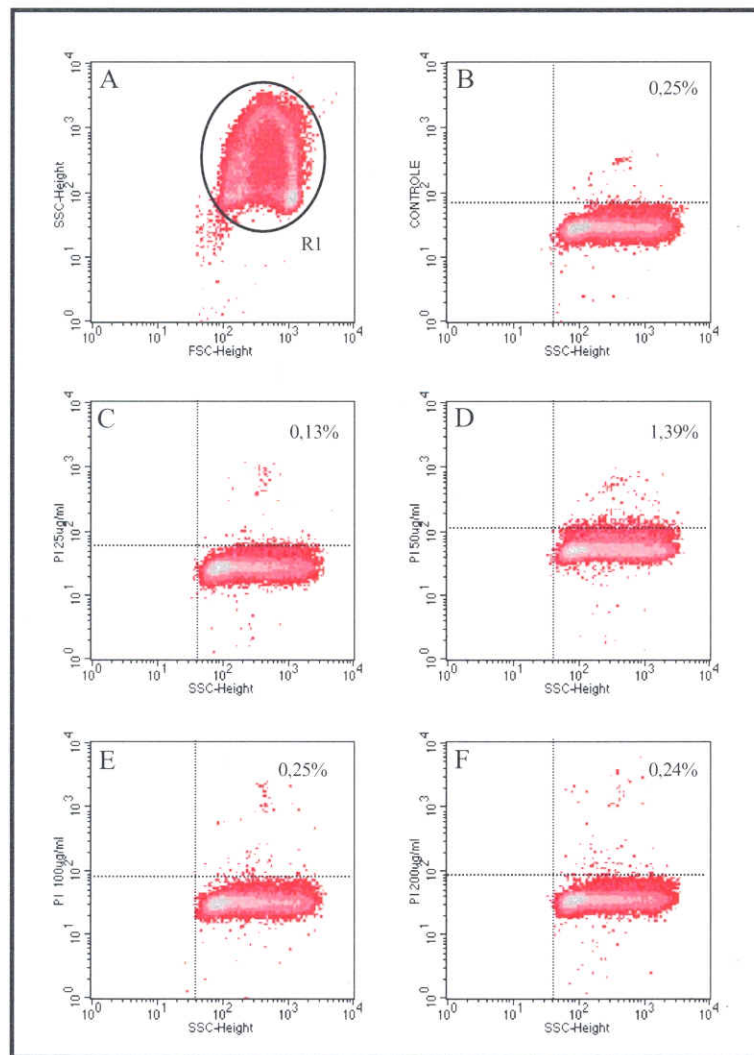


Figura 3. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de sangue total de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Iodeto de Propídeo (0, 25, 50, 100 e 200µg/ml) a 37°C por 1 hora. (A) Seleção da população de hemácias; (B-F) PHFP.

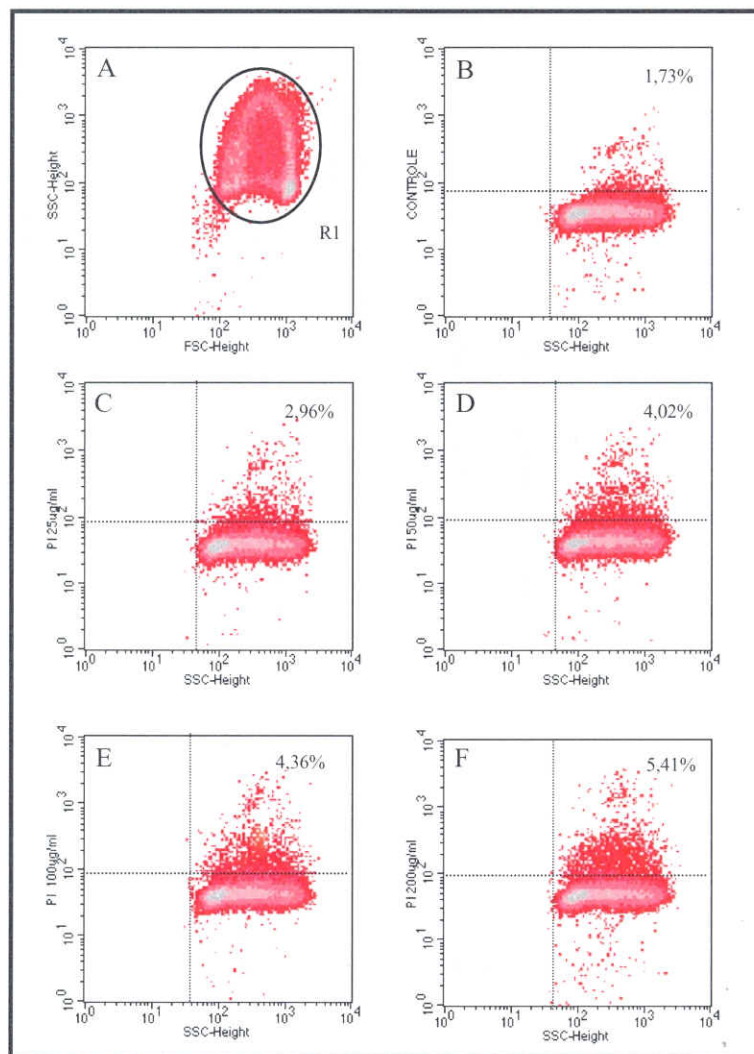


Figura 4. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de sangue total de um cão controle positivo com concentrações crescentes de iodeto de Propiídeo (0, 25, 50, 100 e 200µg/ml) a 37°C por 1 hora. (A) Seleção da população de hemácias; (B-F) PHFP.

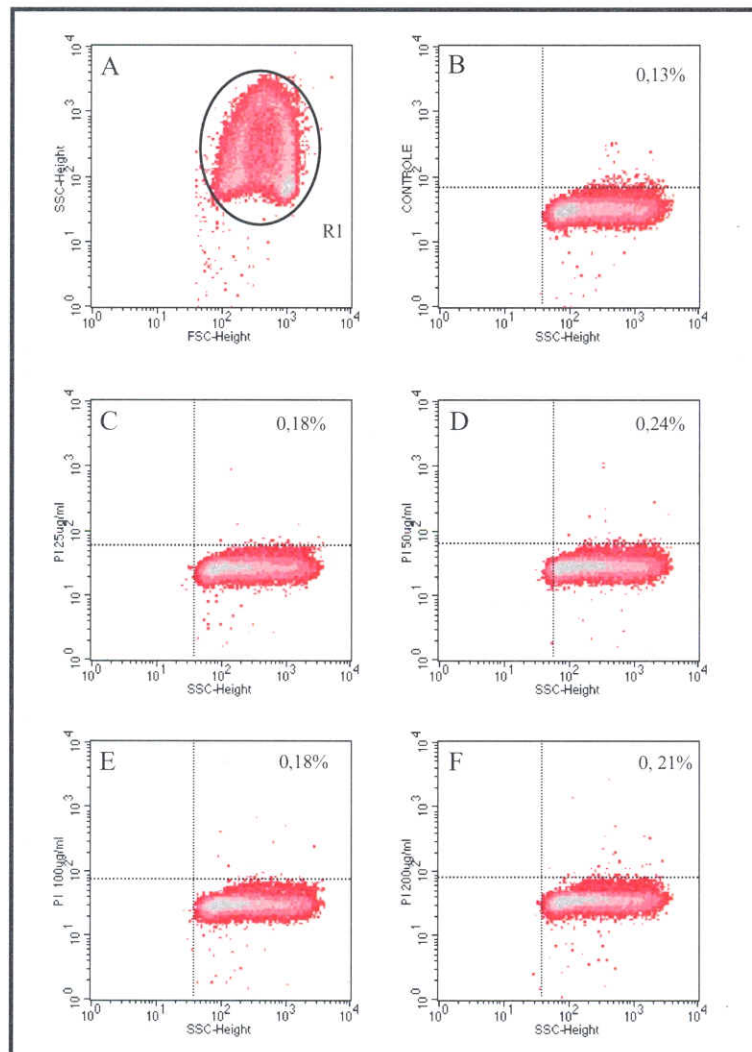


Figura 5. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Iodeto de Propídeo (0, 25, 50, 100 e 200µg/ml) a 37°C por 1 hora. (A) Seleção da população de hemácias; (B-F) PHFP.

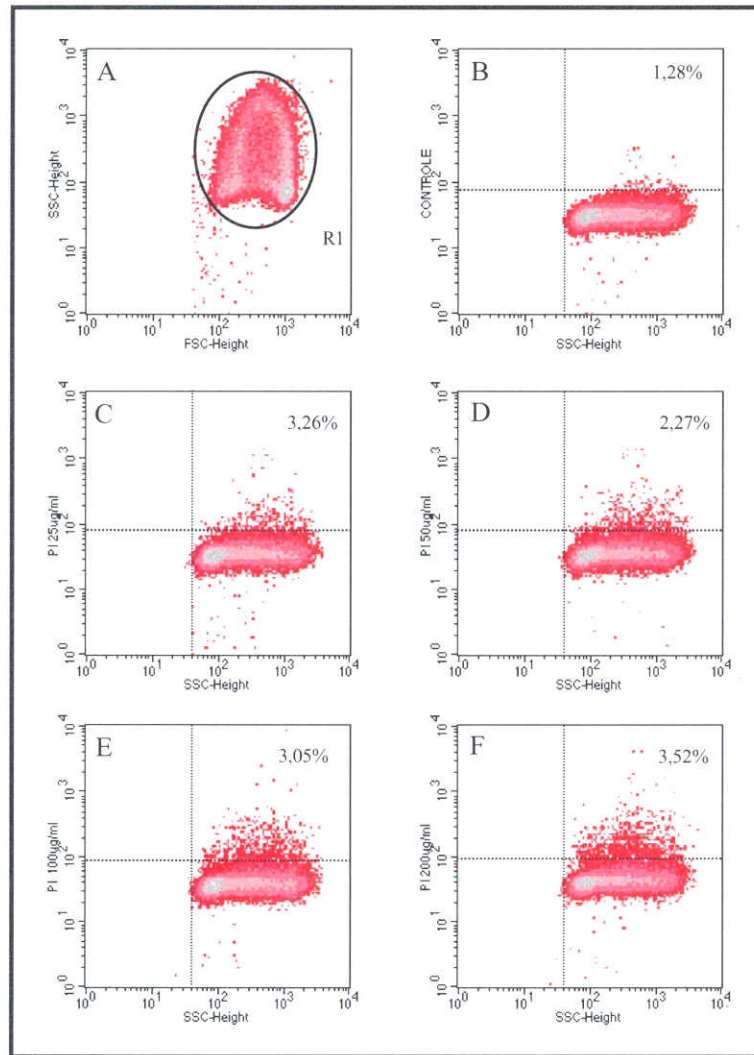


Figura 6. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Iodeto de Propídeo (0, 25, 50, 100 e 200µg/ml) a 37°C por 1 hora. (A) Seleção da população de hemácias; (B-F) PHFP.

Hidroetidina (HE)

De forma interessante, os ensaios preliminares demonstraram que também foi possível a detecção de hemácias parasitadas com *B. canis* marcadas com HE através da citometria de fluxo. Embora tenha sido observada marcação de hemácias após incubação de hemácias de um cão controle negativo, os valores de PHFP nunca ultrapassavam a 2% (Figuras 6 e 8). Já a PHFP após incubação de hemácias de um cão controle positivo foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparada aos resultados obtidos com PI. Foi verificado que apesar dos ensaios conduzidos com suspensão de sangue total apresentarem maiores valores de PHFP (Figura 7), os resultados obtidos nos ensaios onde se utilizou suspensão de papa de hemácias lavadas, incubadas com 150 μ l de solução de HE 25 μ /ml, revelaram menos

debris durante a leitura no citômetro (Figura 9). Embora a literatura recomende o uso de HE a 50 μ /ml, não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) no resultados obtidos após incubação de hemácias com HE 25 μ /ml, sendo escolhido este reagente nesta concentração para padronização da técnica.

O maior valor de PHFP obtido foi de 18,49% (Figura 7-D), próximo da parasitemia capilar (18,60%), detectada por esfregaço sanguíneo. No sangue venoso a parasitemia era de 1,07%.

As amostras de sangue do controle positivo, mantidas resfriadas a 4°C por três, 24 e 48 horas, não mostraram diferença estatisticamente significativa na marcação com HE, quando comparada com marcação de hemácias recém colhidas.

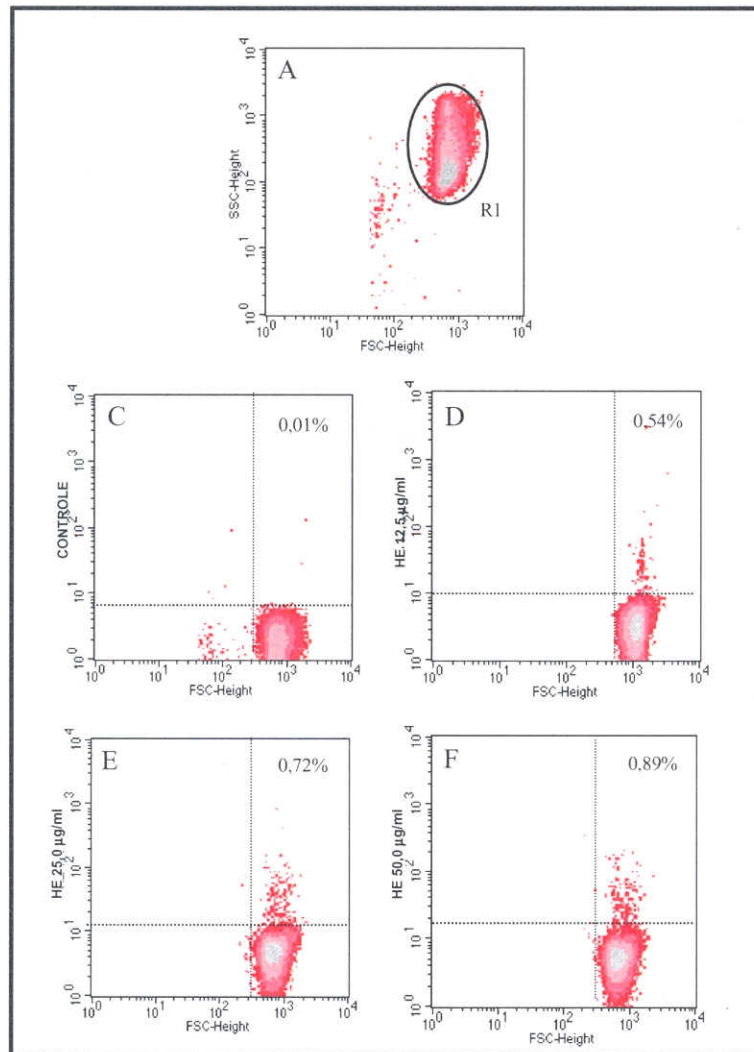


Figura 7. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de sangue total de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50 µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP.

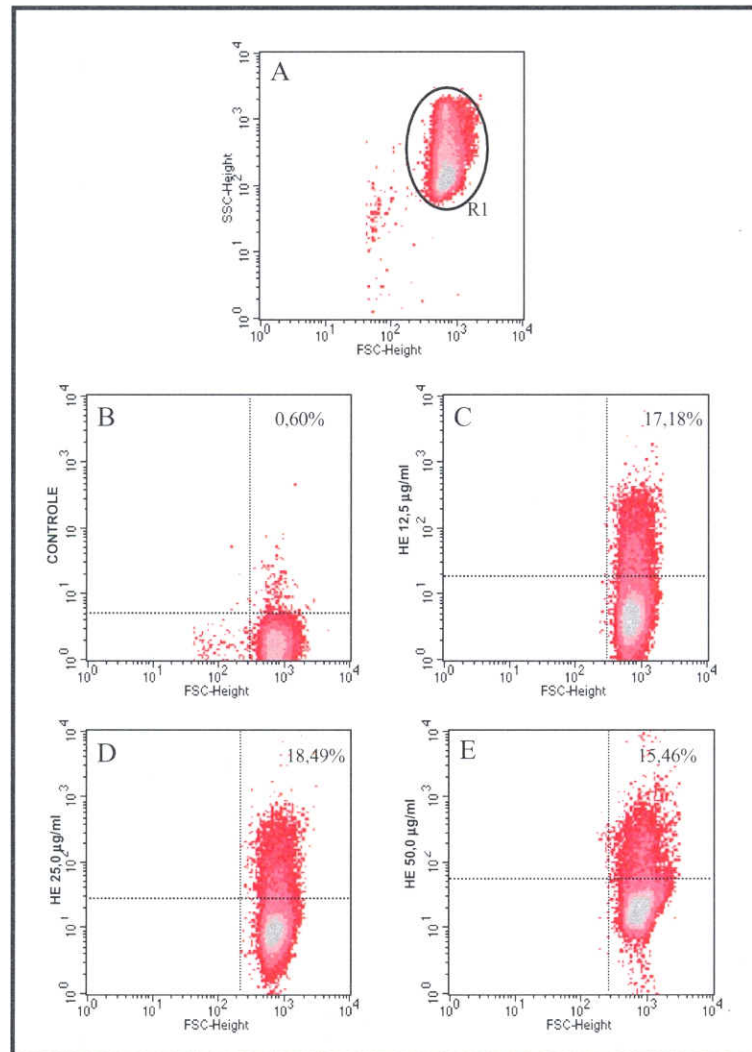


Figura 8. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão sangue total de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP.

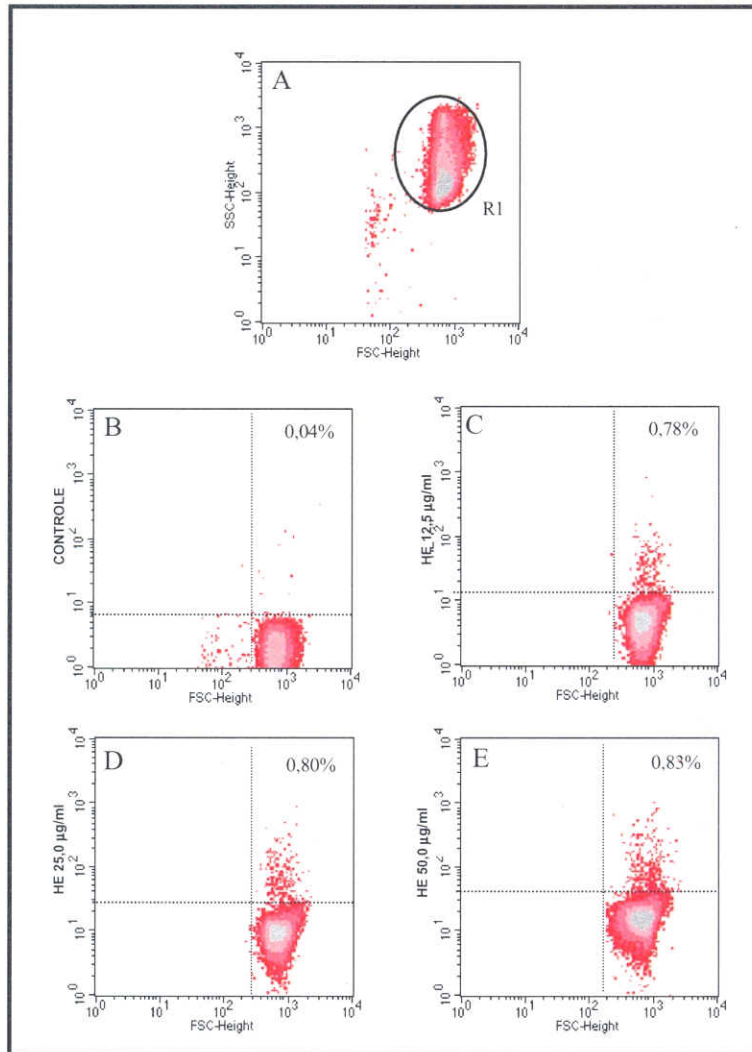


Figura 9. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle negativo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP.

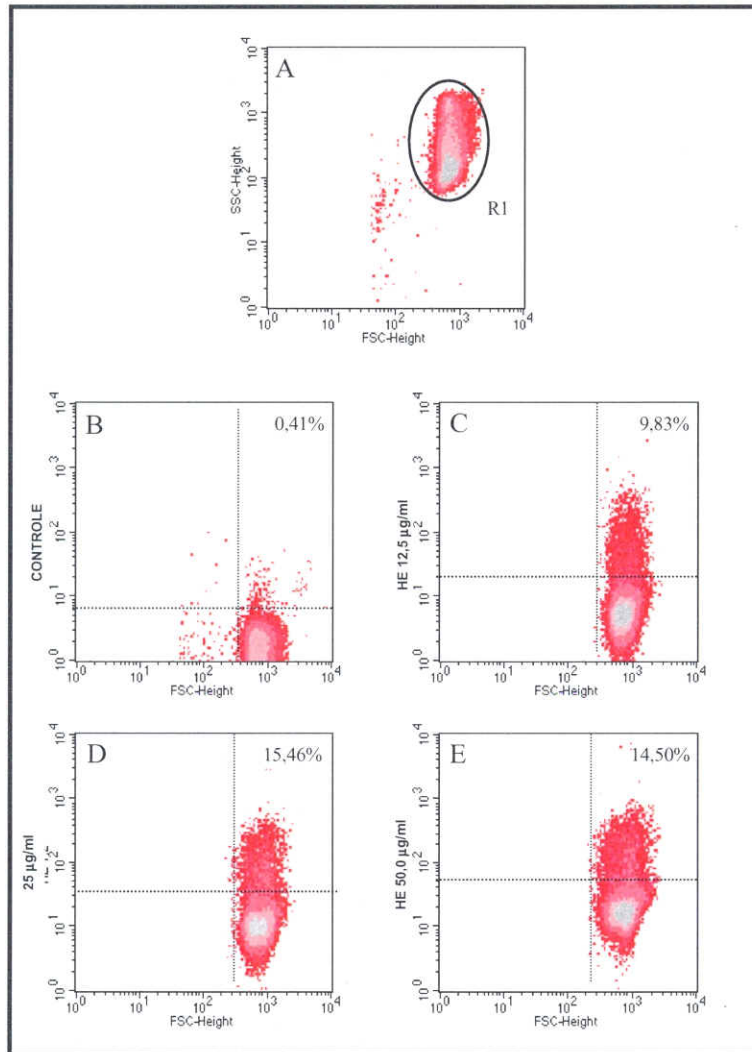


Figura 10. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP.

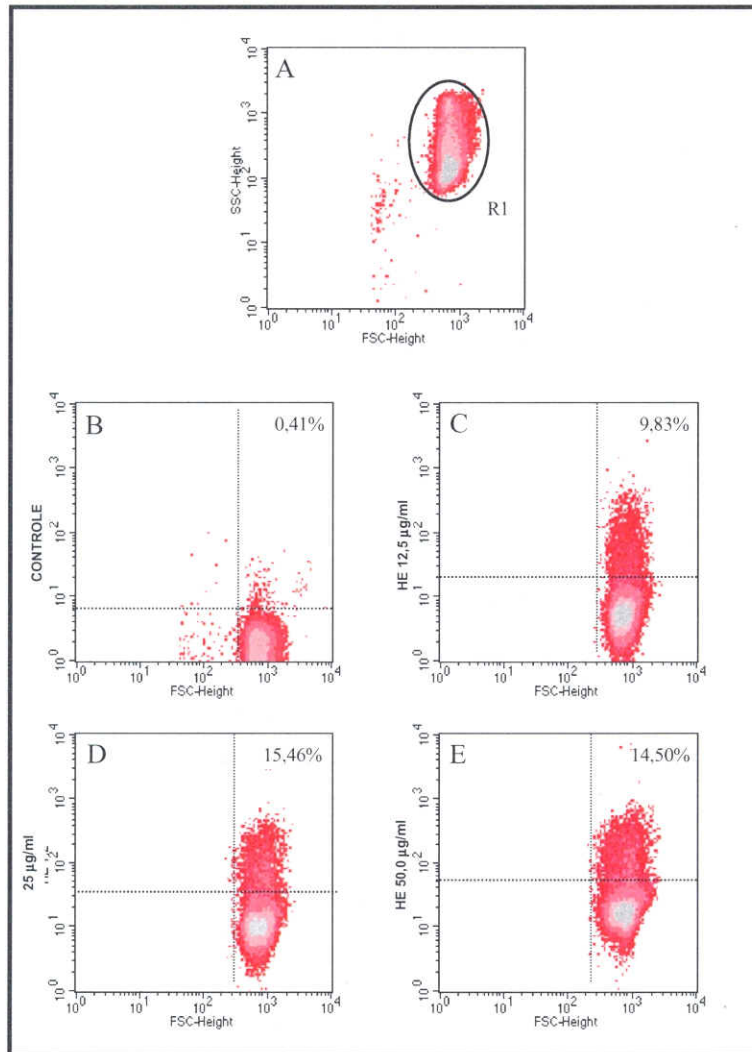


Figura 10. Análise do percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) após incubação com suspensão de papa de hemácias lavadas de um cão controle positivo com concentrações crescentes de Hidroetidina (0, 12,5, 25,0 e 50µg/ml) a 37°C por 20 minutos. (A) Seleção da população de hemácias; (B-E) PHFP.

5.2.3. Limiar de reatividade

Os resultados de PHFP de cães não infectados e infectados com *B. canis* estão mostrados na Figura 11.

Utilizando-se a definição de ponto de corte como sendo a média dos valores do grupo não infectado acrescida de dois desvios padrões, foi obtido o PHFP de 1,53% como um limiar de reatividade entre amostras positivas e negativas.

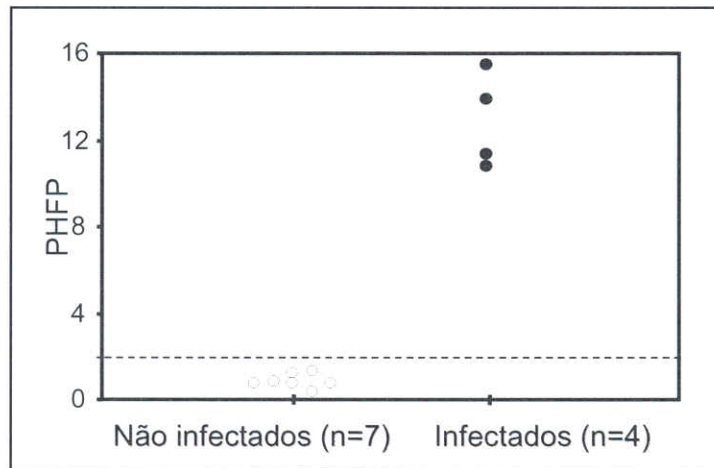


Figura 11: Análise de PHFP de cães infectados e não infectados com *Babesia canis*

5.2.4. Estudo longitudinal por citometria de fluxo de cães inoculados com *B. canis*

Com relação aos resultados de análise de parasitemia capilar, venosa e PHFP dos cães infectados experimentalmente com as amostras de *B. canis* isoladas em Belo Horizonte (Cão 1) e em Lavras (Cão 2), foi observado que as primeiras hemácias parasitadas foram detectadas no segundo dia após inoculação e o pico de parasitemia ocorreu no terceiro dia. Este pico foi significativamente maior nos esfregaços de sangue capilar do cão 1(15,07%), do que no sangue venoso (1,32%). No cão 2, esses dados foram de 1,40 e 1,28% respectivamente.

A partir do quarto dia, a parasitemia caiu drasticamente, sendo detectada em níveis muito baixos (em torno de 0,01%). A presença de *Babesia* passou a ser um achado inconstante nos esfregaços, com

eventuais períodos de ausência e pequenas elevações periódicas da parasitemia, que não obedeceram um padrão de comportamento. A parasitemia foi mais facilmente detectada nos esfregaços de sangue capilar do que venoso, nos dois animais.

Os resultados da PHFP obtidos por citometria de fluxo, mostraram que esta técnica foi mais eficaz na detecção de *B. canis*, principalmente durante a fase crônica da infecção. Um aumento gradativo da PHFP ocorreu a partir do terceiro dia após inoculação nos dois animais (Cão 1:1,81% e Cão 2: 1,79%). No cão 1, a partir do quarto dia, a detecção de *B. canis* passou a ser constante, não sendo detectado valores inferiores ao ponto de corte estabelecido, durante todo o período de acompanhamento do animal. No cão 2, resultados semelhantes foram obtidos a partir do oitavo dia.

Nas Figuras 12 e 13 estão mostrados os resultados referentes às médias semanais da parasitemia capilar, venosa, hematócrito e PHFP do cão 1 e os resultados do acompanhamento diário do cão 2. No cão 1, a média semanal da amplitude da parasitemia variou de 0,01 a 2,34% no sangue capilar e 0,01 a 0,24% no venoso e a partir da 17ª semana, não foi detectada parasitemia nos esfregaços. No cão 2, a amplitude da parasitemia variou de 0,01 a 1,4% nos esfregaços capilares e de 0,01 a 1,24% O hematócrito dos animais que no início do experimento apresentava valores normais, apresentou reduções significativas no início do parasitemia e oscilou durante todo o período de acompanhamento dos animais. A média semanal do hematócrito variou de 17,71 a 34,51%. No cão 2, o valor médio do HT foi de 24,80% \pm 6,05 e o valor mínimo observado foi 19, no nono dia após inoculação.

Elevações periódicas da PHFP foram observadas e também não obedeceram a um padrão de comportamento. No cão 1, o primeiro pico de PHFP ocorreu na quarta semana (21,64%), que não coincidiu com o pico de parasitemia capilar detectado por esfregaço sangüíneo, na primeira semana (2,34%). Foram observados quatro picos de PHFP, durante o acompanhamento do animal. Dois deles coincidiram com elevações da parasitemia capilar e dois não mostraram nenhuma relação. Os níveis médios de PHFP variaram de 2,62% (primeira semana) a 21,64% (quarta semana) e foram significativamente maiores

do que as médias de parasitemia encontradas nos esfregaços sangüíneos capilares e venosos. A média global de PHFP foi de 10,71 \pm 6,22 (Figura 12).

No cão 2, o primeiro pico de PHFP ocorreu no 11º dia (6,81%) e também não coincidiu com o pico de parasitemia detectado nos esfregaços sangüíneos no terceiro dia. Um segundo pico foi detectado no 18º dia (11,27%), quando então a PHFP começou a declinar novamente, chegando a 3,0% no 21º dia após inoculação. A média de PHFP foi de 4,23% \pm 3,30, também significativamente maior do que as parasitemias médias encontradas nos esfregaços sangüíneos (Figura 13).

Os cães permaneceram aparentemente normais. O cão 1 que foi acompanhado por um período maior (28 semanas), apresentou palidez de mucosas, que coincidiu com quedas bruscas do hematócrito e discreto emagrecimento no terço final do experimento.

Com relação ao cão mantido como controle negativo, os resultados mostraram valores estáveis de hematócrito (\bar{x} = 42,39% \pm 5,51) e ausência de parasitemia nos esfregaços, tanto empregando sangue capilar quanto venoso. A PHFP apresentou pequenas variações no período, mas a média semanal variou de 0,22 a 1,52%, abaixo do limiar de reatividade estabelecido (Figura 14).

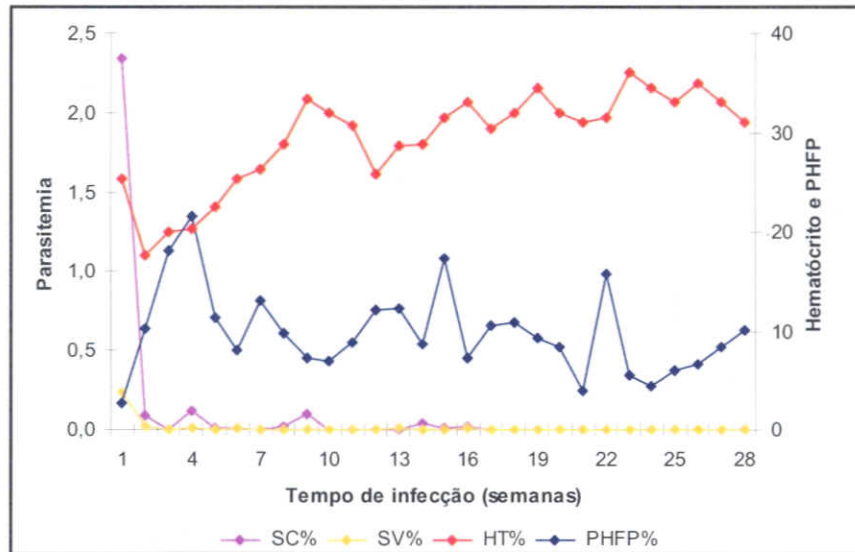


Figura 12 – Inoculação experimental de *Babesia canis* de Belo Horizonte em um cão: média semanal de parasitemia capilar (SC) e venosa (SV); hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).

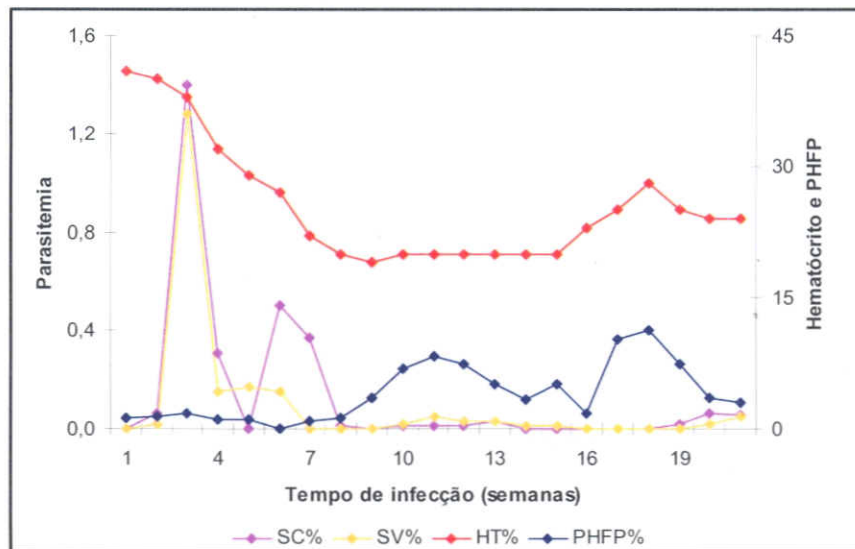


Figura 13 - Inoculação experimental de *Babesia canis* de Lavras em um cão: acompanhamento diário da parasitemia capilar (SC) e venosa (SV); hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).

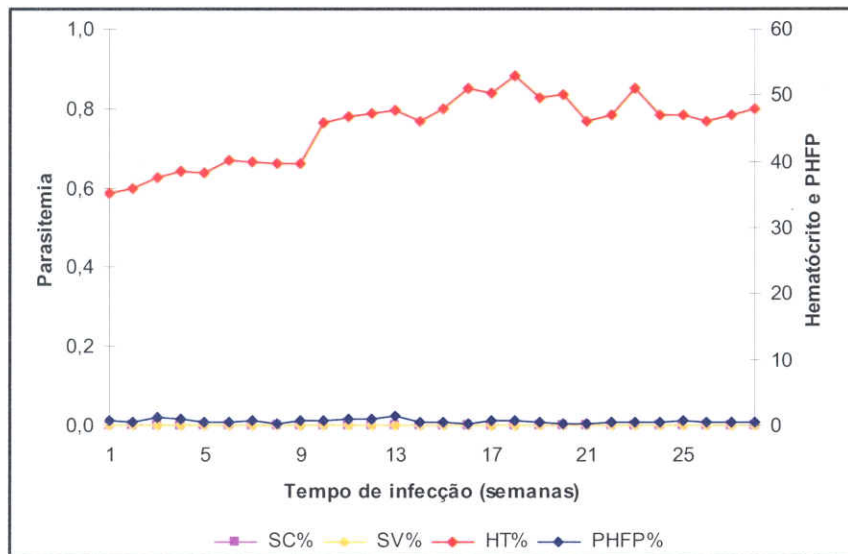


Figura 14 – Parâmetros laboratoriais de um cão controle negativo: esfregaço de sangue capilar (SC) e venoso (SV), hematócrito (HT) e porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).

5.2.5. Emprego da citometria de fluxo no diagnóstico de *B. canis* nas clínicas veterinárias

Os resultados da análise dos parâmetros laboratoriais das 162 amostras de sangue colhidas de cães nas clínicas veterinárias estão mostrados na Figura 15.

Os animais positivos à citometria de fluxo apresentaram hematócrito médio de 27,6% \pm 11,4, que foi significativamente menor ($P < 0,05$) que o hematócrito dos animais negativos (38,7% \pm 11,0). Observou-se que

valores mais baixos de HT predominam em animais com PHFP positivo (Figura 16).

A avaliação da relação dos animais positivos à RIFI e os valores de hematócrito, demonstrou que RIFI positivo predomina em animais com valores mais altos de hematócrito (Figura 17).

Com relação a avaliação dos animais positivos à citometria de fluxo e os títulos de RIFI foi observado que PHFP positivo predomina em animais com títulos mais baixos de RIFI (Figura 18).

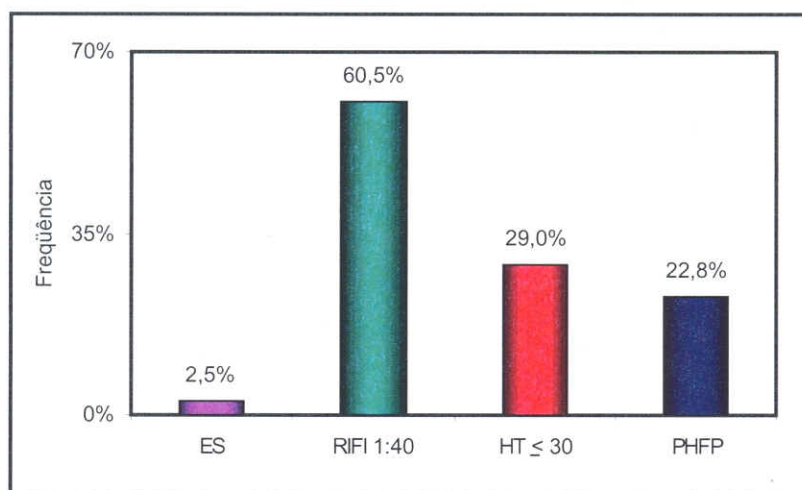


Figura 15 – Parâmetros laboratoriais de cães atendidos em clínicas veterinárias de BH: Esfregaço sangüíneo (ES), RIFI 1:40, Hematócrito \leq 30 e Porcentagem de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).

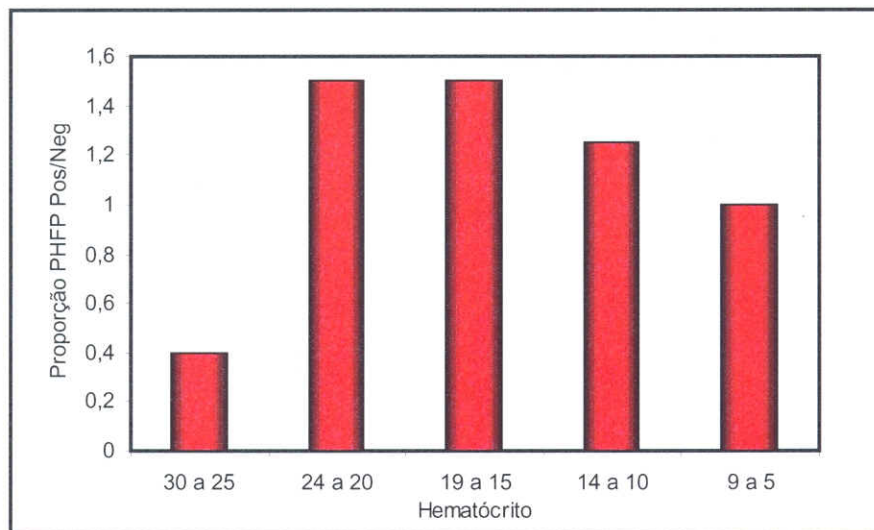


Figura 16 – Análise da proporção de PHFP positivo/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes valores de hematócrito.

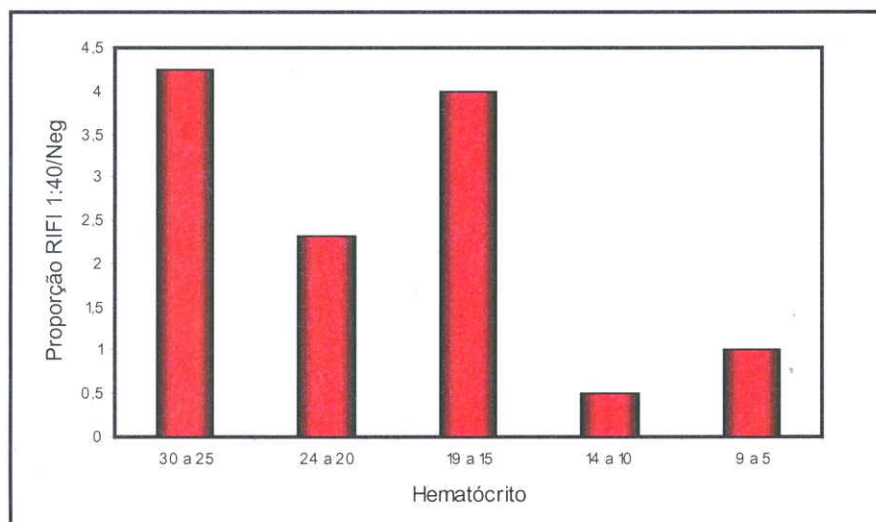


Figura 17 - Análise da proporção de RIFI 1:40/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes valores de hematócrito.

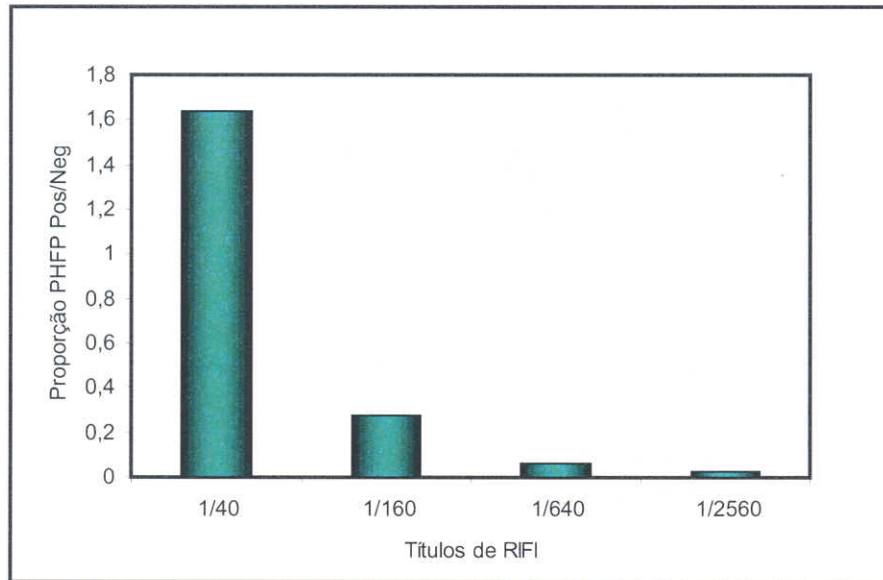


Figura 18 - Análise da proporção de PHFP positivo/negativo em cães atendidos em clínicas veterinárias apresentando diferentes títulos de RIFI.

Das 162 amostras sanguíneas colhidas nas clínicas veterinárias, obteve-se informações a respeito da idade de 150 cães, das quais foi realizado um estudo da frequência da positividade para *B. canis* à citometria de fluxo (CF), RIFI e das associações de positivos à CF, RIFI e HT de acordo com a faixa etária. Os resultados estão mostrados na Tabela 4. Em todas as faixas etárias foram detectados animais com valores de PHFP $\geq 1,53$ e com sorologia positiva para *B. canis*. Entretanto, não foi constatado

haver diferença significativa ($P < 0,5$) na frequência de positividade para *B. canis* entre elas.

Das 162 amostras sanguíneas colhidas nas clínicas veterinárias, obteve-se informações a respeito de sinais clínicos de 123 cães, das quais foi realizado um estudo da frequência de positividade para *B. canis* por CF. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 4. Frequência da positividade para *B. canis* por Citometria (CF), RIFI e Hematócrito (HT), segundo faixa etária, em 150 cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte, de março a setembro de 2000.

Faixa etária (ano)	Nº de animais	Positivos à CF		Positivos à RIFI		Positivos à CF e RIFI		Positivos à CF e HT	
		Pos	%	Pos	%	Pos	%	Pos	%
< 1	38	7	18,4	25	65,8	4	10,5	6	15,8
1 - 3	31	6	19,4	21	67,7	5	15,1	1	3,2
4 - 7	42	11	26,2	28	66,7	9	21,4	4	9,5
8 - 9	12	6	50,0	8	66,7	2	16,7	4	33,3
≥ 10	27	7	25,9	12	44,4	2	7,4	5	18,5
Total	150	37	24,7	94	62,7	22	14,7	20	13,3

RIFI 1:40; PHFP $\geq 1,53$

Tabela 5. Frequência da positividade para *B. canis* por Citometria (CF), de acordo com os sinais clínicos observados em 123 cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte, de março a setembro de 2000.

Sinais clínicos	Frequência de sinais observados	Nº de animais positivos à CF	
		Pos	%
Febre	19	4	21,0
Anorexia	61	13	21,3
Letargia	41	11	26,8
Mucosas pálidas	41	17	41,5
Outros	115	29	25,2

Das 162 amostras sanguíneas colhidas nas clínicas veterinárias, obteve-se informações a respeito de suspeita clínica de 143 cães, das quais foi realizado um estudo da frequência de positividade por CF. Os resultados mostraram maiores frequência de positividade nos animais com suspeita de neoplasias (53,9%), hemoparasitoses (34,8%) e alterações no sistema digestivo (Tabela 6).

Das 162 amostras sanguíneas colhidas nas clínicas veterinárias, obteve-se informações a respeito do sexo de 156 cães, das quais foi realizado um estudo da frequência de positividade para *B. canis* por CF. Verificou-se que não houve diferença significativa de positividade entre machos e fêmeas (Tabela 7).

Tabela 6. Frequência da positividade para *B. canis* por citometria (CF), segundo a suspeita clínica, em 143 cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte, de março a setembro de 2000.

Suspeita clínica	Número de casos*	Nº de animais positivos à CF	
		Pos	%
Saudável	5	1	20,0
Alterações no sistema digestivo	29	4	13,3
Alterações no sistema genital	13	4	30,8
Alterações no sistema respiratório	10	1	10,0
Alterações no sistema urinário	20	3	15,0
Cinomose	11	1	9,1
Hemoparasitose	23	8	34,8
Leishmaniose	4	1	25,0
Leptospirose	2	1	50,0
Neoplasia	13	7	53,9
Outras alterações	16	5	31,3
Total	146	36	24,7

*10 animais tiveram mais de uma suspeita clínica

Tabela 7. Frequência da positividade para *B. canis* por citometria (CF) e RIFI, de acordo com o sexo, em 156 cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte, de março a setembro de 2000.

Sexo	Número de animais	Nº de animais positivos à CF		Nº de animais positivos à RIFI	
		Pos	%	Pos	%
M	68	16	23,5	41	60,3
F	88	20	22,7	54	61,4
Total	156	3	23,1	95	60,9

RIFI 1:40

Das 162 amostras sanguíneas colhidas nas clínicas veterinárias, obteve-se informações a respeito da forma de criação (casa ou apartamento) de 85 cães, das quais foi realizado um estudo da frequência de positividade para *B. canis* por CF. Verificou-se que não há diferença significativa ($P < 0,05\%$) de positividade para *B. canis*

entre cães criados em casa ou apartamento (Tabela 8).

Associações de animais positivos à citometria de fluxo com presença de carrapato e frequência de banho carrapaticida não foram feitas devido à inconstância de dados obtidos.

Tabela 8. Frequência da positividade para *B. canis* por Citometria (CF) e RIFI, de acordo com a forma de criação, em 85 cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte, de março a setembro de 2000.

Forma de criação	Número de animais	Nº de animais positivos à CF		Nº de animais positivos à RIFI	
		Pos	%	Pos	%
Casa	65	18	27,7	48	73,9
Apto	20	3	15,0	13	65,0
Total	85	21	24,7	61	71,8

RIFI 1:40

6 DISCUSSÃO

A alta prevalência da infecção por *B. canis* nos grandes centros urbanos, devido à constante presença do vetor *R. sanguineus*, associada às dificuldades do diagnóstico clínico e laboratorial atualmente existente da babesiose canina na rotina das clínicas veterinárias de pequenos animais, focalizam a busca de novos métodos que possam aprimorar o diagnóstico etiológico da infecção, através de técnicas de maior especificidade e sensibilidade. Devido as limitações apresentadas pelos diagnóstico clínico (diferentes formas de apresentação clínica e diagnóstico diferencial) e diagnóstico laboratorial (esfregaço sangüíneo: baixa especificidade; RIFI: soroc conversão tardia e não identificação de infecção ativa), muitos animais são tratados com quimioterápicos e/ou drogas variadas, sendo que muitos deles chegam a óbito por falta de tratamento adequado. Dessa forma, tem-se procurado novas alternativas de detecção e análise do parasito, destacando-se a citometria de fluxo, que tem mostrado resultados promissores pela sua rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade.

No estudo da ocorrência de *B. canis* nos cães atendidos em clínicas veterinárias de Belo Horizonte, os resultados confirmaram a baixa sensibilidade do método de esfregaço sangüíneo (2,5%), quando se utilizou o diagnóstico parasitológico, a alta sensibilidade da RIFI em detectar anticorpos anti-*B. canis* (60,5%) quando se utilizou o diagnóstico sorológico, e chamaram atenção para a frequência de positividade de cães com PHFP $\geq 1,53\%$ (22,8%), demonstrando a sensibilidade da técnica em detectar hemácias parasitadas quando comparado com o método de esfregaço sangüíneo.

Neste estudo, foram comparados dois métodos de marcação de hemácias para identificação de *B. canis*, através da citometria de fluxo. Os resultados mostraram que hemácias infectadas puderam ser separadas de hemácias não infectadas baseando-se na marcação do DNA do parasito com HE ou PI, permitindo sua identificação. A comparação dos

resultados entre os dois métodos avaliados mostrou que HE é significativamente mais eficiente para identificação de hemácias parasitadas do que o PI. A baixa PHFP obtida nos resultados de marcação de hemácias parasitadas com PI pode ser devido ao fato deste composto não ser vital e das hemácias terem sido previamente fixadas com glutaraldeído. Este fixador reduz significativamente o efeito da emissão de fluorescência de certos fluorocromos que se ligam ao DNA (Crissmann et al., 1979). Além disso, este composto possui o inconveniente de marcar RNA de reticulócitos, dificultando a discriminação das células parasitadas das não parasitadas (Mons & Janse, 1992).

Nos ensaios conduzidos com PI e HE foram constatados maiores valores de PHFP ao se utilizar sangue total em comparação ao sangue lavado. Isto provavelmente está relacionado ao processo de lavagem do sangue que possibilita a saída de merozoítos de dentro das hemácias, uma vez que na fase aguda da infecção ocorre intensa multiplicação do parasito e os merozoítos rompem as células, principalmente em condições adversas.

Melhores intensidades de fluorescências obtidas com HE, expressas através dos valores de PHFP, provavelmente estão relacionados ao fato deste composto ser um marcador vital. Sua ação está relacionada à incorporação e metabolização de HE pelo parasito, que é transformada em etídio, um fluorocromo que se intercala ao DNA e pode ser excitado por laser, emitindo uma fluorocromasia que pode ser detectável pela citometria de fluxo (Gallop et al., 1984). Assim, a HE marca apenas organismos vivos e não marca RNA de reticulócitos, eliminando as falsas reações por não marcar outras células do hospedeiro, fato comprovado por Fukata et al. (1996).

Os resultados de alta intensidade de fluorescência de hemácias parasitadas com *B. canis* marcadas com HE, obtidos neste estudo, concordam com os relatados por Wyatt (1991), Davis et al. (1992) e Fukata et al. (1996) que também conseguiram

identificar *Babesia* por citometria de fluxo, utilizando este marcador. Entretanto, nos resultados do presente estudo, não foi constatada correlação entre parasitemia detectada nos esfregaços sangüíneos e PHFP detectada pela citometria de fluxo, discordando dos achados de Davis et al. (1992) e Fukata et al. (1996). Estes autores trabalharam com *B. gibsoni*, que apresenta dinâmica de parasitemia diferente das amostras *B. canis*, ou cultivo de *B. bovis* que permite um controle melhor da parasitemia, facilitando a leitura em esfregaços sangüíneos.

Outro fator que pode ter influenciado a baixa correlação entre a parasitemia detectada nos esfregaços sangüíneos e por citometria de fluxo, está relacionado ao fato das amostras sangüíneas, antes de serem analisadas, terem sido armazenadas a 4°C e posteriormente lavadas com PBS. Como foi dito anteriormente, *B. canis*, em condições adversas, rompe as hemácias e permanece viável por pouco tempo no plasma. Assim, o cão que apresentou alta parasitemia na fase aguda, ao ter o sangue armazenado e lavado, pode ter sofrido perda de grande quantidade de hemácias parasitadas com merozoítos, que romperam as células e ficaram no plasma. No entanto, a técnica empregada ainda demonstrou sensibilidade suficiente para detectar PHFP acima do ponto de corte estabelecido.

Foi observado que nos cães atendidos em clínicas veterinárias, PHFP $\geq 1,53\%$ predomina em animais com HT ≤ 30 , sugerindo que baixos valores de HT possam estar relacionados com a multiplicação da *B. canis* e lise das hemácias. Dessa forma, os resultados sugerem a aplicabilidade do hematócrito como um parâmetro de triagem para os casos suspeitos de babesiose e a citometria de fluxo para a confirmação da presença de hemácias infectadas. Estes achados concordam com Reyers et al. (1998) que ao fazerem um estudo retrospectivo de 662 cães com babesiose na África do Sul, relataram que a severidade da anemia está relacionada com a doença hemolítica, possivelmente imunomediada.

De forma contrária, observou-se neste estudo que a maioria dos animais positivos à RIFI apresentam valores mais altos de HT.

A maioria dos animais positivos à citometria de fluxo apresentou título de RIFI 1:40, sugerindo que a parasitemia não coincide com altos títulos de anticorpos. Segundo Ristic (1988), reações sorológicas refletem a multiplicação do parasito no hospedeiro, mas a detecção de anticorpos pode não coincidir com a parasitemia.

Dos 98 animais que apresentaram RIFI negativa para *B. canis*, 14 (14,9%) eram positivos à citometria de fluxo. Três animais tinham menos de quatro meses de idade, hematócrito baixo e sinais clínicos típicos de babesiose. Resultados semelhantes foram encontrados por Farwell (1982), Breitschwerdt (1983) e Bobade (1989), que relataram filhotes infectados com *B. canis* soronegativos através da RIFI. Provavelmente os cães estavam infectados com *B. canis* e ainda não havia produção de anticorpos suficientes para serem detectados por RIFI.

Ainda neste estudo, observou-se que cães que apresentaram sinais clínicos de babesiose como mucosas pálidas, letargia e anorexia estão relacionadas com babesiose, provavelmente na fase aguda da infecção, conforme descrito por Abdullahi et al. (1990). Estes resultados discordam daqueles encontrados por Dell'Porto (1986), em que a autora concluiu que sinais clínicos de febre e mucosas pálidas não constituíam elementos seguros que pudessem auxiliar no diagnóstico da babesiose crônica.

Nas amostras de sangue dos cães atendidos em clínicas veterinárias, foram detectadas freqüências semelhantes de animais positivos à citometria e RIFI em todas as faixas etárias. Nair et al. (1979) e Martinod et al. (1986) verificaram que a idade do animal não influencia a susceptibilidade dos animais à infecção por *B. canis*. Porém, em áreas endêmicas, espera-se que os animais jovens e adultos entrem em contato periódico com o carrapato vetor *R. sanguineus* e sejam inoculados com a forma infectante do

parasito. Considerando-se que os cães adultos provavelmente estão na fase crônica devido aos contatos prévios, espera-se que os cães jovens apresentem maior taxa de infecção. Este fato foi comprovado no presente estudo, pois a maioria dos animais que apresentaram redução intensa do HT, e positividade à citometria de fluxo possuíam menos de um ano de idade (Tabela 9). Mesmo que o animal não apresente sinais clínicos, o parasita ao se multiplicar no hospedeiro, provoca queda do HT e reduz a resistência dos animais. Este achado confirma as observações de Ribeiro et al. (1990). Segundo os autores animais com idade inferior a seis meses constituem a população de cães com risco potencial de adquirir a infecção por *B. canis* em área endêmica de Belo Horizonte, MG. Farwell et al. (1982) e Bobade et al. (1989) também relatam que a maioria dos cães com parasitemia por *B. canis* são jovens, fato observado neste trabalho.

Não foi observada associação entre a frequência de cães positivos por citometria e RIFI com o sexo e a forma de criação dos animais. Estes resultados concordam com Spiewak (1992) e sugerem que mesmo em animais criados em apartamentos, o controle do vetor não é eficaz. Nair et al. (1979), Martinod et al. (1986), Bobade et al. (1989) e Ribeiro et al. (1990) também não observaram diferença de ocorrência da infecção através da RIFI quanto ao sexo, ao contrário de Dell'Porto (1986) que detectou maior ocorrência em fêmeas do que em machos.

A babesiose canina, causada pela *Babesia canis*, é endêmica em Belo Horizonte, conforme demonstrado por Ribeiro et al. (1990) e Spiewak (1992). O isolamento da amostra de BH utilizada neste estudo foi feito a partir de cães adultos, que ao serem esplenectomizados, apresentaram parasitemia detectada nos esfregaços sangüíneos. Estes resultados foram superiores aos obtidos por Ribeiro et al. (1990), que ao realizarem trabalho semelhante, conseguiram isolar o protozoário em 25,0 % dos animais esplenectomizados. Esta variação nos resultados provavelmente está relacionada ao fato dos animais terem sido

esplenectomizados em épocas do ano diferentes. Sabe-se que variações climáticas interferem na população de vetores e consequentemente na taxa de inoculação do parasito (Shakespeare, 1995; Lobbetti, 1998). Os cães livres de infecção e esplenectomizados, que foram inoculados com amostras de *B. canis* isoladas em Belo Horizonte e Lavras, apresentaram parasitemias baixas e inconstantes e permaneceram aparentemente normais. Estes resultados concordam com outros trabalhos realizados no Brasil (Assis, 1993; Ribeiro, 1990), que também constataram infecções inaparentes em cães inoculados com amostras de *B. canis*. Esses dados indicam que a amostra existente em nosso meio é de baixa patogenicidade, geralmente causando infecções inaparentes nos cães.

A severidade da infecção da babesiose canina difere grandemente e depende de vários fatores como a virulência da amostra de babesia isolada, além do estado geral de saúde e competência imunológica do hospedeiro. Segundo Macwilliams (1987), os principais fatores que influenciam o quadro clínico de babesiose canina são a variação em patogenicidade da amostra, intensidade do parasitismo, estado imune do hospedeiro, idade do animal, presença do baço, infecções concorrentes e estresse ambiental.

Atualmente, três subespécies de *B. canis* são reconhecidas: *Babesia canis canis*, que é encontrada na Europa, *Babesia canis vogeli*, que é encontrada no Nordeste da África e Norte da América e *Babesia canis rossi* que é encontrada no Sul da África (Uilenberg et al.; 1989 e Taboada & Merchant, 1991). Apesar da similaridade morfológica, relatos sugerem que estes isolados de *B. canis* induzem diferentes tipos de patologias, variando de doença fulminante, com um aumento exponencial da parasitemia periférica, à infecção inaparente.

Schettters et al. (1997) infectaram cães experimentalmente com isolados de *B. canis canis* isolada da Europa (França) e *B. canis rossi*, isolada da África do Sul. Os autores constataram que o isolado europeu mostrou

ser de baixa patogenicidade, provocando parasitemia transiente, normalmente abaixo de 1%, associada à redução dos valores de HT. A proliferação do parasito ocorreu principalmente em microcapilares de órgãos internos, semelhante à *B. bovis*. Quanto a *B. canis rossi*, ela mostrou ser mais patogênica, observando-se alta parasitemia periférica, maior que 1%, sendo necessário tratamento quimioterápico dos animais.

Em estudo realizado na França, Pages et al. (1990) observaram apenas anemia moderada e trombocitopenia em 133 cães com babesiose, fato também descrito por Carlos et al. (1989) em cães da Filipinas, sendo essa manifestação clínica classificada como crônica ou subclínica. Estas duas amostras são consideravelmente menos virulentas que as da África do Sul, onde provocam severa anemia e as manifestações clínicas são classificadas como aguda ou superaguda.

No Brasil, não existem relatos de caracterização molecular dos isolados de *B. canis* para verificar a ocorrência de subespécies. Os resultados de infecção inaparente de cães esplenectomizados inoculados com *B. canis* e os valores de parasitemia e hematócrito encontrados no presente estudo, sugerem que a amostras sejam de baixa virulência. Como o único vetor de *B. canis* descrito no Brasil é o *R. sanguineus*, sugere-se que nossa amostra seja a *B. canis vogeli* que apresenta virulência semelhante à da *B. canis canis* (Shaw, 2001).

O perfil de parasitemia observado nos animais esplenectomizados, inoculados experimentalmente com amostra de *B. canis* isoladas em Minas Gerais, foi semelhante ao descrito por Assis (1993), utilizando isolado de São Paulo. Na primeira semana após a inoculação ocorreu pico de parasitemia e, posteriormente, houve redução das hemácias parasitadas, que permaneceram em número baixo e, às vezes, com períodos de ausência. Esse fato está relacionado com a fisiopatogenia do parasito, envolvendo seqüestro de hemácias parasitadas e não parasitadas. Também há proliferação do parasito no interior de capilares viscerais, resultando em

adesão aos receptores das células endoteliais. Na fase inicial, o parasito se multiplica intensamente na corrente circulatória, sendo facilmente detectado em esfregaços sangüíneos. Nesta fase, ocorrem liberações de antígenos solúveis que se ligam a hemácias não parasitadas, favorecendo a adesão dos mesmos. Esta adesão também é potencializada pelo desencadeamento da cascata de coagulação na fase aguda da doença, com liberação de fibrina que recobre as hemácias, favorecendo sua ligação aos receptores do endotélio. Os antígenos também provocam ativação simultânea de outros sistemas, como caliceína e sistema de complemento, resultando na liberação de mediadores vasoativos dentro da circulação que levam à vasodilatação e hipotensão. As hemácias aderidas e a vasodilatação levam à diminuição do fluxo sangüíneo na microvasculatura e, eventualmente, estase, diminuindo a oxigenação dos tecidos (Schetters & Montenegro-James, 1995; Schetters et al. 1998, Schetters & Eling, 1999). Nesta fase, torna-se difícil a detecção dos parasitos em esfregaços sangüíneos. Conforme foi observado para *B. canis canis* e provavelmente também ocorre com a *B. canis vogeli*, a amostra de *B. canis* utilizada neste estudo localiza-se em tecidos profundos, principalmente no pulmão, baço, rins, leptomeninges, lâmina própria do estômago e intestinos delgado e grosso (Breitschwerdt et al., 1983). Esta localização visceral dos parasitos explica a visualização mais fácil em esfregaços de sangue capilar, fato observado também por Dell Porto (1986), Ribeiro et al. (1990), Spiewak (1992) e Assis (1993).

A queda do HT verificada nos animais experimentalmente inoculados é resultado direto da ruptura das hemácias no momento da liberação dos merozoítos. Aliada à ruptura, há um aumento da atividade do sistema monocítico-fagocitário do baço e do fígado, retirando hemácias parasitadas e não parasitadas da circulação (Mahoney, 1977). Como há ruptura de hemácias e redução drástica do HT, seria de se esperar a ocorrência concomitante de hemoglobinúria. Entretanto, neste estudo, este fato só foi constatado em um cão

esplenectomizado, inoculado com a amostra de BH. Tem sido hipotetizado, que devido à hipotensão, há extravasamento do líquido intersticial para a circulação, causando redução do HT e do nível de creatinina (Schetters et al., 1998). Decréscimo do HT tem sido demonstrado após inoculação de extrato solúvel de *Babesia*, mas este decréscimo é apenas temporário, confirmando que as hemácias não são destruídas mas simplesmente diluídas no maior volume de plasma (Schetters & Montenegro-James, 1995).

Os resultados de PHFP, obtidos dos cães inoculados experimentalmente, mostraram eficiência na detecção de hemácias parasitadas, inclusive durante a fase crônica da infecção, na qual o animal estava aparentemente saudável. Isto ressalta a necessidade de um diagnóstico laboratorial com melhor eficácia para detecção de babesiose canina e demonstra a importância do portador crônico na manutenção da infecção no ambiente. Além disso, muitos animais são levados às clínicas veterinárias após o início da fase aguda da infecção, quando a detecção do parasito em esfregaços sangüíneos é muito difícil. Este fato ficou comprovado com os resultados obtidos das amostras de sangue dos cães atendidos em clínicas veterinárias, onde foi detectado maior positividade de PHFP do que em esfregaços sangüíneos, mesmo quando as hemoparasitoses não eram suspeitas clínicas.

Os resultados obtidos sugerem que a detecção de *B. canis* por citometria de fluxo possa auxiliar no diagnóstico de animais tanto com babesiose aguda como crônica e com diferentes suspeitas clínicas. Além disso, a existência de uma relação entre resultados de PHFP positivo com valores mais baixos de hematócrito, sugerem a recomendação do uso da citometria de fluxo no esclarecimento diagnóstico em casos de animais apresentando valores de hematócrito ≤ 30 .

7 CONCLUSÕES

- A técnica de citometria de fluxo pode ser empregada para detecção de hemácias parasitadas com *B. canis* tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção.
- A técnica de citometria de fluxo aumenta a frequência de detecção de *B. canis* no sangue, quando comparada com esfregaços sangüíneos.
- A Hidroetidina é mais eficiente para marcar hemácias parasitadas com *B. canis* do que o Iodeto de Propídeo.
- A maioria dos animais atendidos em clínicas veterinárias positivos para *B. canis* pela citometria de fluxo, apresentaram valores mais baixos de hematócrito e baixos títulos de anticorpos detectados pela RIFI.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, SU.; MOHAMMED, AR.; TRIMNELL, A. et al. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. *J. Small Anim. Pract.*, v.31, p.145-7, 1990.
- ANDERSON, JF.; MAGNARELLI, LA.; SULZER, AJ. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n. 12, p.2102-5, 1980.
- ASSIS, CB. *Estudo de aspectos hematológico, bioquímico e imunológico em cães não esplenectomizados e esplenectomizados inoculados com Babesia canis*. Botucatu: UNESP-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1993. 93p. Tese.
- BANSAL, SR.; GAUTAM, OP.; BANERJEES, DP. Prevalence of *Babesia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Hissar (Haryana) and Delhi and attempts to isolate *Babesia* from human beings. *Indian Vet. J.*, v. 62, p.748-51, 1985.

- BOBADE, PA.; ODUYE, OO.; AGHOME; HO. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v.42, n. 2, p.211-7, 1989.
- BREITSCHWERDT, EB.; MALONE, JB.; MACWILLIAMS, P. et al. Babesiosis in the Greyhound. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.182, n. 9, p.978-82, 1983.
- CARLOS, ET.; RADELAD ER.; MANZON, JC. Haematological studies of clinical cases of canine babesioses. *Philippine J Vet Med.* v. 26, p.29-36, 1989.
- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot Microbiol.*, v. 46, n. 3, p.298-303, 1999.
- CONRAD, PA.; THOMFORD, J. W.; MARSH, A. et al. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 30, p.1210-1215, 1992.
- CRISSMANN, HA.; STEVENSON, AP.; KISSANE, R. J. et al. In: MELAMED, M. R.; MULLANEY P. F., MENDELSON M. L. (eds.) *Flow cytometry and sorting*. New York: Wiley, 1986, p.234-262.
- CRUZ-VAZQUES, C.; GARCIA-VAZQUEZ, Z. Sazonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Exp Appl Acarol.* v. 23, n.3, p.277-280, 1999.
- DAVIS, WC.; WYATT, CR.; HAMILTON, MJ., et al. A rapid, reliable method of evaluating growth and viability of intraerythrocytic protozoan hemoparasites using fluorescence flow cytometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.87, suppl. 3, p.235-239, 1992.
- DELL'PORTO, A. *Estudo da ocorrência de Babesia canis (Piana & Galli-Valerio, 1895) em cães de rua da cidade de São Paulo: Avaliação de métodos de diagnóstico e características do quadro hemático*. São Paulo: USP - Instituto de Ciências e Biomédicas, 1986. 95p. Tese.
- FARWELL, GE.; LEGRAND, EK.; COBB, CC. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, n. 5, p.507-511, 1982.
- FUKATA, T.; OHNISHI, T.; Okuda, S. et al. Detection of canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni* by flow cytometry. *J. Parasitology.* v.82, n.4, 1996. p.641-642
- GALLOP, P.; PAZ, M; HENSON, E. et al. Dynamic approaches to the delivery of reporter reagents into living cells. *Bio Techniques* 1, p.32, 1984.
- HOWARD, R. J; RODWELL, B. J. *Babesia rodhaini*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* : Analysis and sorting of red cells from infected mouse or calf blood by flow fluorimetry using 33258 Hoechst. *Experimental parasitology.* v. 48, p.421-431, 1979.
- Técnicas para el diagnóstico de babesioses e anaplasmoses bovinas. San José: IICA. 1987. 79p.
- JANSE, CJ.; VIANEN, PH. Flow cytometry in malaria detection. In: AULT, KA, MITCHELL, J. *Methods in cell Biology*. Academic Press, 1994, p.295-318.
- JAROSZESKI, MJ.; RADCLIFF, G. Review: fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology*, v.11, p.37-53, 1999.
- KLINFELTER, MR. Cause, diagnosis, and treatment of canine piroplasmosis. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.*, v. 77, p.1505-1508, 1982.

- LEVY, MG.; BREITSCHWERDT, EB.; MONCOL, DJ. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Caroline. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, n. 3, p.339-41, 1987.
- LEWIS, BD.; PENZHORN, BL.; LOPEZ-REBOLLAR, L.M. et al. Isolation of South African vector-specific strain of *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.*, v.63, p.9-16. 1996.
- LINHARES, GFC.; MASSARD, CL.; ARAÚJO, JLB. et al. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rural Rio J.*, v. 15, p. 85-91, 1992.
- LOBETTI, RG. Canine Babesioses. *The compendium on continuing education for the practicing veterinarian.*, v.20, n.4, p.418-430, 1998.
- LOSOS, GJ. *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals*. Canada: Logman Scientific and Technical, 1986. 938p.
- MACWILLIAMS, PS. Erythrocytic rickettsia and protozoa of the dog and cat. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.17, n. 6, p.1443-1461, 1987.
- MAHONEY, DF. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J.P. (ed.) *Parasitic Protozoa*. New York: Academic Press, 1977. p.1-52.
- MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. *Vet. Parasitol.*, v.19, p.245-54, 1986.
- MEYNARD, JA.; GOUDICHAUD, JA. Piroplasmose canine. Caractères cliniques. *Anim. Compagnie*, n. 2, p.147-155, 1974.
- MONS, B.; JANSE, CJ. In: LAERUM, OD., BJERKNES, R. (eds.) *Flow cytometry in hematology*. London: Academic Press, 1992, p.197-211
- NAIR, RPN.; PAL, M.; DUBE, GD. A preliminary report on the occurrence and treatment of *Babesia* infection in dogs. *Indian J. Anim. Res.*, v.13, p.95-97, 1979.
- O'DWYER, LHO. *Diagnóstico de hemoparasitas e carrapatos de cães provenientes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil*. Rio de Janeiro: UFRJ -Instituto de Biologia, 2000. 97p. Tese.
- OLMEDA, AS.; ARMSTRONG, PM.; ROSENTHAL, BM. et al. A subtropical case of human babesioses. *Acta tropica*. v.37, p.229-234, 1997.
- PAGÈS, JP.; VIDOR, E.; TROUILLET, JL. et al. Description clinique, hémalogique et sérologique de 133 cas de babésiose canine. *Prat. Med. Chirur. Anim. Comp.*, v.21, p.111-5, 1990.
- PARAENSE, WL.; VIANNA, YL. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 44, p.595-603, 1949.
- PATTANAPANYASAT, K.; WEBSTER, HK.; UDOMASANGPETCH, R. et al. *Cytometry*, v. 13, p. 182-187, 1992.
- PATTON, WS. Rapport préliminaire sur un nouveaupiroplasma, *P. gibsoni* nov. sp. Trouvé dans le sang du chien de madras et du chacal *Canis aureus*. *Bull Société Pathologie Exotic*, v.3, p.274-280, 1910.
- PERSING, DH.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, WF. et al. Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* v.30, p.2097-2103, 1992.
- PESTANA, BR. O Nambyuvú. *Rev. Méd.*, v. 22, p.423-6, 1910.
- PIANA, GP.; Galli-Valerio, B. Su di un'infezione del cane com parassiti endoglobulari nel sangue. Nota preventiva. *Il Moderno Zoiatro.*, v.6, p.163-169, 1895.

- PONGPONRATN, E.; RIGANTI, M.; PUNPOOWONG, B. et al. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.44, n.2, p.168-175, 1991.
- REYERS, F.; LEISEWITZ, AL.; LOBETTI, RG. et al. Canine babesioses in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for *falciparum malaria*? *Annals Trop. Medic. Parasitol.*, v.92, n.4, p.503-511, 1998.
- RIBEIRO, MFB.; PASSOS, LMF.; LIMA, JD. et al. Frequência de anticorpos fluorescentes anti- *Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 42, n. 6, p.511-517, 1990.
- RISTIC, M. *Babesioses of Domestic Animals and Man*. Flórida: CRC PRESS, 1988. 255p.
- RISTIC, M.; LYKINS, JD.; SMITH, AR. *B. canis* and *B. gibsoni*: soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs. *Exp. Parasitol.*, v.30, p.385-392, 1971.
- SAUL, A.; MYLER P.; MANGAN, T.; KIDSON, C. *Exp. Parasitol.*, v. 54, p. 64-71, 1982.
- SCHETTERS, TPM.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, v.115, p.485-93, 1997.
- SCHETTERS, TPM.; MONTENEGRO, J. Vacines against babesioses using soluble parasite antigens. *Parasitology Today.*, v.11, n.12, p.456-462, 1995.
- SCHETTERS, TPM.; KLEUSKENS, J., SCHOLTES, N. et al. Parasite localization and dissemination in the *Babesia* - infected host. *Annals Trop. Med. Parasitol.* v.92, n.4, p.513-519, 1998.
- SCHETTERS, TPM.; ELING, WMC. Can *Babesia* infections be used as a model for Cerebral Malaria? *Parasitology Today*, v.15, n.12, p.492-497, 1999.
- SHAKESPEARE, AS. The incidence of canine babesioses amongst sick dogs presented to the Onderstepoort Veterinary Academic Hospital. *J. S. Afr. Veterin. Assoc.*, v.66, n4, p.247-250, 1995.
- SHAW, SE; DAY, MJ.; BIRTLES, RJ. et al. Tick - borne infectious diseases of dogs. Disponível em <www. Science Direct - Trends in Parasitology> Acesso em 9 de fevereiro de 2001.
- SPIEWAK, G. *Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por Babesia canis, em cães atendidos em clínicas veterinárias, em Belo Horizonte*. Belo Horizonte: UFMG- Escola de Veterinária, 1992. 67p. Dissertação
- TABOADA, J; MERCHANT, SR. Babesioses of companion animals and man. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v.21, p.103-123, 1991.
- TABOADA, J.; HARVEY, J.; LEVY, MC. et al. Seroprevalence of Babesiosis in Greyhounds in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.200, p.47-50, 1992.
- THOMFORD, JW.; CONRAD, PA., TELFORD, SR. et al. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. *J. Inf. Disease.* v. 169, p.1050-1056, 1994.
- UEMURA, T; SUZUKI, S; OHNISHI. Flow cytometric enumeration of reticulocyte in the piferal blood from canine infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med.*, v. 37, p.468-472, 1990.
- UILEMBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne diseases of domestic animals. *J. Parasitol.*, v.72., p.485-491, 1986.
- UILEMBERG, G.; FRANSSEN, FFJ.; PERIÉ, NM.; SPANJER, AAM. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.*, v.1, p.33-40, 1989.

VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using IFAT. *Parasite*, v.2, p.407-10, 1995.

WAHLGREN, M.; CARLSON, J.; UDOMSANGPETCH, R. et al. Why do *Plasmodium falciparum* - infected retyocytes form spontaneous severe immunodeficiency mouse model for cerebral malaria. *J. Exp. Med.*, v.182, p.643-645, 1995.

WLOSNIIEWSKI, A.; LERICHE, MA.; CHAVIGNY, C. et al. Étude du portage assymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.20, p.75-86, 1997.

WRIGHT, IG.; GOODGER, BV.; BUFFINGTON, GD. et al. Immunopathophysiology of babesial infections. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.83, p.11-13, 1989.

WRIGHT, JC.; CHAMBERS, M.; MULLEN, GR. et al. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in dogs in Alabama, USA. *Prev. Vet. Med.*, v.31, p.127-31, 1997.

WYATT, CR.; GOFF, W.; DAVIS, WC. A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *J. of Immunol. Methods*, v.140, p.23-30, 1991.

YAMANE, I.; GARDNER, IA., RYAN, CP. et al. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. *Prev. Vet. Med.*, v.18, p.293-304, 1994.

YAMANE, I.; THOMFORD, JW.; GARDNER, IA. et al. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, 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. *Parasitol. Res.*, v.87, p.544-548, 1998.

ANEXO

FICHA INDIVIDUAL

Clínica:

Ficha nº:

Data:

RAÇA:

SEXO:

IDADE:

FORMA DE CRIAÇÃO:

 casa apartamento

PRESENÇA DE CARRAPATO:

 atual passado nunca teve observado ao exame clínico

FREQUÊNCIA DE BANHO CARRAPATICIDA:

 mensal semanal nunca produto utilizado

SINTOMAS CLÍNICOS:

 febre anorexia ou apetite caprichoso letargia, fraqueza, depressão mucosas pálidas outros

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA - BIBLIOTECA

Deposição de Resumo dos cursos de
Pós-Graduação Preço 57,00Data 28/11/01