

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

**DISSERTAÇÃO**

**Detecção molecular e epidemiologia da infecção de  
*Babesia vogeli* em cães domiciliados da Microrregião  
de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

**Patrícia Gonzaga Paulino**

**2018**



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

**Detecção molecular e epidemiologia da infecção de *Babesia vogeli* em  
cães domiciliados da Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de  
Janeiro, Brasil**

**Patrícia Gonzaga Paulino**

*Sob a orientação do Professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

*Sob a co-orientação do Professor*  
**Carlos Luiz Massard**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2018



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P328d PAULINO, PATRICIA GONZAGA, 1990-  
Detecção molecular e epidemiologia da infecção de  
Babesia vogeli em cães domiciliados da Microrregião  
de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil /  
PATRICIA GONZAGA PAULINO. - 2018.  
103 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Coorientador: Carlos Luiz Massard.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, PPGCV, 2018.

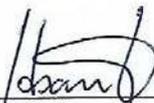
1. Parasitologia Veterinária. 2. Epidemiologia. 3.  
Biologia Molecular. 4. Genética. I. Santos,  
Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II. Massard,  
Carlos Luiz, 1947-, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGCV. IV. Título.

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

PATRÍCIA GONZAGA PAULINO

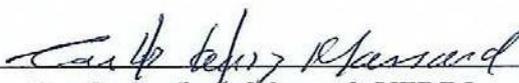
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21 / 02 / 2018



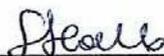
---

Dr. Huarrisson Azevedo Santos UFRRJ  
(Orientador)



---

Dr. Carlos Luiz Massard. UFRRJ  
(Co-Orientador)



---

Dr.ª Irene da Silva Coelho. UFRRJ



---

Dr. Daniel de Barros Macieira. UFF

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a Jesus Cristo que me deu essa oportunidade de estar aqui hoje e me guia nas minhas escolhas, aos meus amados pais Shirley Gonzaga Paulino e José Paulino Neto, que além de pais maravilhosos foram meus grandes amigos e confidentes. Eles me incentivaram e apoiaram durante toda minha vida. Amo muito vocês!*

*“Quem é sábio procura aprender, mas os tolos estão satisfeitos com a sua própria ignorância”*

*(Bíblia Sagrada, Provérbios 15:14)*

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.

—“Old Man's Advice to Youth: 'Never Lose a Holy Curiosity.'” *LIFE Magazine* (2 May 1955) p. 64”

— Albert Einstein

**“Vivi come se dovessi morire domani.  
Impara come se dovessi vivere per  
sempre.”**

- **Gandhi**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar minha caminhada, pela Sua misericórdia, Seu infinito amor por mim e pelo plano Dele em minha vida.

Aos meus pais José e Shirley, pelo amor, confiança, conselhos e apoio que sempre me dedicaram. Vocês são parte importante desta obra.

Aos meus amigos, por entenderem a minha ausência, pelo apoio e pelos momentos de alegria. Agradeço a torcida de cada um de vocês.

A minhas amigas Juliana Velloso Pinto e Bruna Gonçalves por me entenderem e me apoiarem durante a minha jornada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, meu segundo lar, onde tive a oportunidade de cursar a Graduação em Medicina Veterinária e o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias ao nível de Mestrado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos, por acompanhar de perto cada passo dado nessa caminhada, pela amizade, estímulo e pelos ensinamentos. Obrigada por acreditar em mim e pela dedicação incansável.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard, por todo carinho e incentivo, por me acolher em sua equipe, pela amizade e pelos preciosos ensinamentos tanto na área da Parasitologia Animal como na vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) concessão da bolsa durante o Mestrado e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos conhecimentos transmitidos.

À toda equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRJ), Claudia Bezerra Silva, Maristela Peckle, Ana Paula M. Abreu, Marcus Sandes Pires, Gabriela Vitari pela amizade e pelas orientações acadêmicas. Agradeço a amiga, Renata Lins, por ter somado imensamente na minha formação e neste trabalho, pelas risadas e pela maravilhosa convivência.

À toda equipe do Laboratório de Sanidade Avícola, Tays Camilo, Débora Santos, Miguel Leite Motta, Rodrigo Gredilha, Roberta Tollomelli, Alexandra Cortez, Thamyris Sampaio pela amizade e ajuda no dia a dia.

A todos os amigos e colegas do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, por todo incentivo, ajuda, alegria e pelo ótimo convívio.

Ao time de basquete da UFRJ pela amizade e ótimo convívio.

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

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Patrícia Gonzaga Paulino, filha de José Paulino Neto e Shirley Gonzaga Paulino, nasceu em 17 de julho de 1990, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Estudou no Colégio Franciscano do Sagrado Coração de Jesus, onde cursou o ensino fundamental e o ensino médio, em Cabo Frio, Rio de Janeiro, concluindo em 2008.

No ano de 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de Medicina Veterinária com graduação sanduíche na Università degli Studi di Milano (2013-2014).

Durante a graduação foi monitora nas disciplinas de Anatomia Animal (2011), Patologia Clínica (2014-2015), Histopatologia e Histopatologia especial (2015), realizou dois estágios de iniciação científica sendo um financiado pela Fundação de apoio à pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) na área de Biofísica Animal sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Michelle Porto Marassi (2011-2013), e outro financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na área de Parasitologia no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz, sob a orientação do professor Dr. Huarrisson Santos Azevedo, na UFRRJ (2014-2015). Também participou de projetos de extensão do Programa de Educação Tutorial (PET) do Ministério da Educação (MEC) (2013).

Fez estágio externo na Università degli Studi di Milano, na Itália, auxiliando no diagnóstico de diversas doenças de importância Médico Veterinária (2013-2014) e no Deutsches Institut für Ernährungsforschung, na Alemanha, aprendendo novas tecnologias laboratoriais (2015).

No ano de 2016, concluiu o curso de Medicina Veterinária.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado, área de concentração Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2016, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos, sendo contemplada com bolsa da CNPq.

Ao longo do curso de mestrado, entre os anos de 2016 e 2017, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de diversos projetos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz e no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE), localizado no Instituto de Veterinária.

## RESUMO

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Detecção molecular e epidemiologia de *Babesia vogeli* em cães domiciliados da Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 103p.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

As doenças vetoriais que acometem cães são diagnosticadas com alta frequência nas clínicas veterinárias brasileiras. Esse grupo representa um complexo variado de moléstias incluindo anaplasnose, ehrliquiose, babesiose, rangelirose, hepatozoonose entre outras enfermidades. Muitos desses patógenos causam severas condições clínicas, óbito de pacientes e ainda, em alguns casos, possuem potencial zoonótico. Existe uma variedade de métodos diagnósticos para esses agentes no mercado. As técnicas moleculares têm como base a detecção do DNA dos agentes etiológicos diretamente do sangue com alta sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção mesmo em condições de parasitemias muito baixas, que são muitas vezes características de animais portadores assintomáticos, e permite a distinção entre diferentes espécies de parasitos. Neste estudo foi desenvolvido dois métodos moleculares para detecção de *Babesia vogeli* em amostras de sangue de cães provenientes da Microrregião de Itaguaí, baseados na tecnologia de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) com alvo específico no gene *hsp70* de *B. vogeli*. Após os processos de otimização e padronização das técnicas, foi observado que a qPCR desenvolvida neste estudo foi eficiente, apresentando alta precisão e sensibilidade na detecção de *B. vogeli*. Foi realizado estudos comparativos entre os alvos *18S rDNA* e *hsp70* usando cPCR, onde, foi possível observar que não existem diferenças estatísticas significativas entre os dois alvos. Porém no sequenciamento foi detectado um falso positivo para *B. vogeli* na sequência *18S rDNA*, um hemoprotozoário proximamente relacionado com *Rangelia vitalli* na região. As técnicas de cPCR e qPCR foram comparadas quanto a detecção de *B. vogeli* e foi observado que a qPCR tem maior sensibilidade. Além disso, foi realizado em paralelo um estudo epidemiológico, o qual evidenciou três fatores associados a infecção presença de *B. vogeli* sendo estes animais jovens (com menos de 5 anos), infestação por carrapatos e a ausência de abrigos.

**Palavras-Chave:** PCR, hemoparasitos, cães, epidemiologia, diagnóstico.

## ABSTRACT

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Molecular detection and epidemiology of *Babesia vogeli* in domiciliated dogs from Itaguaí microrregion, Rio de Janeiro State, Brazil. 103p.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Canine vector diseases are frequently found in Brazilian veterinary clinics. This group represents a varied complex of illness including anaplasmosis, ehrlichiosis, babesiosis, rangeliiosis, hepatozoonosis among other diseases. Many of these pathogens cause severe clinical conditions, death of patients and in some cases, have zoonotic potential. There are a variety of diagnostic methods for these microorganism on the market. Molecular techniques are based on the detection of DNA from the etiological agents directly from the blood with high sensitivity and specificity, allowing the detection even under conditions of very low parasitemias, which are often characteristic of asymptomatic carriers. Also allows the distinction between different species of parasites. In this study, two molecular methods were developed for the detection of *Babesia vogeli* in blood samples from dogs from the Itaguaí Microregion, based on quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) technology and polymerase chain reaction (cPCR) with a specific target in *hsp70* gene from *B. vogeli*. After the optimization and standardization of the techniques, it was observed that the qPCR developed in this study was efficient and presented high precision and sensitivity in the detection of *B. vogeli*. Comparative studies were performed between the *18S rDNA* and *hsp70* targets using cPCR, where it was possible to observe that there are no statistically significant differences between the two targets, but in the sequencing a false positive for *B. vogeli* was detected in the *18S rDNA* sequence, a proximal hemoprotozoal related to *Rangelia vitalli*. The cPCR and qPCR techniques were compared for the detection of *B. vogeli* and it was observed that qPCR has higher sensitivity. In addition, an epidemiological study was carried out, which showed three factors associated with *B. vogeli* infection among these were young animals (less than 5 years old), the infestation by ticks and the absence of shelters.

**Keywords:** PCR, hemoparasites, dogs, diagnosis

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIC: Coeficiente de Akaike  
BR: Brasil  
CA: Califórnia  
CEUA/UFRRJ: Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ  
Cq: Ciclo de quantificação  
ddNTPs: dideoxirribonucleotídio trifosfato  
DE: Detroit  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
dsDNA: DNA double strand (DNA fita dupla)  
EDTA: ácido etileno-amino-tetracético  
EUA: Estados Unidos da América  
hsp: Heat shock protein (proteína de choque térmico)  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IC: Intervalo de Confiança  
Km: quilometro  
LAMP: loop-mediated isothermal amplification assay  
MA: Maryland  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
N: número de cães  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
OR: *Odds Ratio*  
P: p-valor  
pb: pares de base  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
cPCR: PCR convencional  
nPCR: Nested PCR  
qPCR: PCR em tempo real  
R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação  
*rDNA*: ácido desoxirribonucleico ribossomal  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism  
SRD: Sem raça definida  
μL: microlitro  
°C: Celsius  
ΔRn: Sinal fluorescente máximo normalizado reportado

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1:

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição geográfica dos agentes patogênicos e dos seus respectivos vetores. Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011.	11
<b>Tabela 2.</b>	Combinações das concentrações de oligoiniciadores para otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de <i>Babesia vogeli</i> .	25
<b>Tabela 3.</b>	Análise dos pares discordantes entre os resultados da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) com base no gene da proteína de choque térmico 70 kDa ( <i>hsp70</i> ) para detecção molecular de <i>Babesia vogeli</i> em cães.	33
<b>Tabela 4.</b>	Análise dos pares discordantes entre os resultados das sequências da região ribossômica 18S ( <i>18S rDNA</i> ) e da proteína de choque térmico 70 kDa ( <i>hsp70</i> ) usando PCR convencional para a detecção molecular de <i>Babesia vogeli</i> em cães.	34

### CAPITULO 2:

<b>Tabela 1.</b>	Análise descritiva e bivariada das características extrínsecas dos cães infectados por <i>Babesia vogeli</i> , diagnosticados através do gene <i>hsp70</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.	67
<b>Tabela 2.</b>	Análise descritiva e bivariada das características intrínseca dos cães infectados por <i>Babesia vogeli</i> , diagnosticados através do gene <i>hsp70</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.	69
<b>Tabela 3.</b>	Matriz de correlação dos valores obtidos no teste de phi.	69
<b>Tabela 4.</b>	Modelo de regressão logístico final dos fatores associados à infecção dos cães por <i>Babesia vogeli</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016	71

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1:

- Figura 1.** Ciclo biológico de protozoários do gênero *Babesia spp.* 13
- Figura 2.** Inclusões intraeritrocitárias ovaladas de *Babesia vogeli*, encontradas durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X. (Escala: 20µm). 23
- Figura 3.** Alinhamento das espécies de *Babesia* que acometem os cães. 31
- Figura 4.** Curva de dissociação do fragmento de 118 pares de base do gene *hsp70* de *Babesia vogeli* amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando oligonucleotídeos na concentração de 800nM. 31
- Figura 5.** Curva padrão plotada a partir de diluições decimais em série do amplicon, contendo o gene *hsp70* de *Babesia vogeli*. O valor do ciclo de quantificação (Cq) obtido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real usando a tecnologia TaqMan foi plotado como uma função do número inicial de cópias alvo. 32
- Figura 6.** Árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com sequências parciais do gene *hsp70* de *Babesia vogeli* e outros *Babesia spp.* Os números nos ramos indicam o valor de Bootstrap com 1000 pseudorepetições. Apenas as porcentagens de Bootstrap acima de 70% são mostradas. 35
- Figura 7.** Árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com sequências parciais do gene *18S rDNA* de *Babesia vogeli* e outros *Babesia spp.* e *Rangelia sp.* Os números nos ramos indicam o valor de Bootstrap com 1000 pseudorepetições. Apenas as porcentagens de Bootstrap acima de 70% são mostradas. 36

### CAPITULO 2:

- Figura 1.** Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. 61

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>CAPITULO I - Comparações de alvos e técnicas moleculares na detecção de <i>Babesia vogeli</i> em cães e estudo filogenético da região ribossomal 18S rDNA e do gene <i>hsp70</i></b>	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	9
2.1 Histórico	9
2.2 Sistema taxonômico	10
2.3 Distribuição geográfica	11
2.4 Morfologia	11
2.5 Meios de transmissão	12
2.6 Ciclo biológico	13
2.7 Patogênese	12
2.8 Sinais clínicos	13
2.9 Diagnóstico laboratorial	1
2.9.1 Exame Citopatológico	15
2.9.2 Sorologia	15
2.9.3 Testes Moleculares	16
2.9.3.1 Sequenciamento	19
2.9.3.2 Filogenia	19
2.10 Tratamento	20
2.11 Importância em Saúde Pública	21
2.12 Profilaxia	21
<b>3. METODOLOGIA</b>	23
3.1 Determinação da amostra padrão	24
3.2 Amostragem	24
3.3 Extração do DNA genômico, quantificação e pureza	24
3.4 Desenvolvimento e otimização das PCR	24
3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos	20
3.4.2 As reações	25
3.4.3 Padronização da PCR convencional	25
3.4.4 Padronização da PCR em tempo real	25
3.4.5 Cuidados para evitar contaminações	27
3.5 PCR convencional com alvo na região ribossomal 18S rDNA	27
3.6 Avaliação do desempenho da técnica	28
3.6.1 Análise da especificidade analítica da técnica	28
3.6.2 Análise da sensibilidade analítica da técnica	29
3.8 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR para sequenciamento	29
3.9 Sequenciamento e análise filogenética	29
3.10 Análise estatística	30
3.12 Considerações éticas	30
<b>4. RESULTADOS</b>	30

<b>5. DISCUSSÃO</b>	37
<b>6. CONCLUSÃO</b>	40
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41
<b>CAPITULO II - Aspectos epidemiológicos associados a presença do DNA de <i>Babesia vogeli</i> em cães na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil</b>	56
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	59
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	59
2.1 Aspectos Epidemiológicos	59
<b>3.METODOLOGIA</b>	61
3.1 Descrição da região estudada	62
3.2 Tamanho da amostragem e coleta	68
3.3 Processamento das amostras	68
3.4 Controle Padrão	63
3.5 Extração de DNA	63
3.6 Detecção molecular	64
3.7 Questionário epidemiológico	64
3.8 Análise estatística	65
3.9 Considerações éticas	66
<b>4. RESULTADOS</b>	67
<b>5. DISCUSSÃO</b>	72
<b>6. CONCLUSÃO</b>	78
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84
<b>ANEXOS</b>	83
Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro	84
Anexo II – Termo de consentimento livre e esclarecido	88
Anexo III – Parecer da CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal	89

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças vetoriais que acometem os cães são de grande relevância na medicina veterinária devido à alta frequência de casos relatados durante o atendimento clínico. Dentro desse grupo complexo e variado, estão inclusas as hemoparasitoses que podem ser definidas como enfermidades cosmopolitas causadas por parasitos circulantes no sangue, transmitidas biologicamente e/ou mecanicamente pela picada de artrópodes hematófagos.

Esses patógenos podem causar sérias complicações clínicas até a morte do animal e ainda alguns possuem potencial zoonótico. Outra característica relevante é a expansão contínua desses agentes por todo o mundo devido as alterações climáticas e o aumento da globalização. Por esses motivos esses agentes são um grande desafio na medicina veterinária e na saúde pública.

As hemoparasitoses mais frequentemente encontradas em cães no Brasil pertencentes a este grupo são a Ehrliquiose Monocítica Canina causada pela *Ehrlichia canis*, Trombocitopenia Cíclica Canina por *Anaplasma platys* e Babesiose Canina por *Babesia vogeli*. Casos de babesiose canina têm sido relatados em muitos Estados brasileiros. Apesar de babesiose canina ser amplamente difundida no Brasil, a prevalência de infecção por *Babesia spp.* em cães é desconhecida na maioria das áreas onde a doença é endêmica.

Os carrapatos são os artrópodes hematófagos responsáveis por transmitir agentes patogênicos ao redor do mundo. No ambiente rural brasileiro e na periferia de áreas urbanas, é comum a presença de cães parasitados por *Amblyomma ovale*, *A. aureolatum* e *Amblyomma spp* e *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. O carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* é considerado um importante vetor de doenças parasitárias sendo responsável pela transmissão de babesiose na América, principalmente no Brasil. A prevalência dos casos de babesiose predominantemente causados por *B. vogeli* no Brasil varia de 18,8% a 73,3% (Spolidorio et al., 2010). Essa variância está relacionada a maior incidência do vetor *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* nas diferentes regiões do país (Dantas-Torres, 2008).

Tendo em vista a grande dispersão das hemoparasitoses no mundo, falta de confirmação dos casos suspeitos e tratamento incorreto este estudo teve como objetivos realizar um estudo comparativo entre as técnicas moleculares PCR convencional (cPCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) na detecção molecular de *B. vogeli*

utilizando o gene codificante da proteína de choque térmico 70kDa (*hsp70*); comparar os marcadores moleculares *18SrDNA* e *hsp70* através da cPCR para detecção de *B. vogeli*; realizar uma análise filogenética baseada utilizando a sequência 18S rDNA e o gene *hsp70*, e realizar um estudo epidemiológico na microrregião de Itaguaí baseado na detecção molecular de *B. vogeli* por qPCR.

## CAPITULO 1

**Comparações de alvos e técnicas moleculares na detecção de *Babesia vogeli* em cães e estudo filogenético da região ribossomal *18S rDNA* e do gene *hsp70***

## RESUMO

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Comparações de alvos e técnicas moleculares na detecção de *Babesia vogeli* em cães e estudo filogenético da região ribossomal 18S rDNA e do gene hsp70. 103p.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Este estudo teve como objetivo comparar a região *18S do DNA ribossômico (18S rDNA)* e o gene da proteína de choque térmico 70kDa (*hsp70*) e as técnicas de PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR) para a detecção molecular de *B. vogeli* em cães naturalmente infectados. Além disso, também foi realizado um estudo filogenético comparando os dois genes para a classificação de *B. vogeli*. O PCR convencional (cPCR) dos genes *18S rDNA* e *hsp70* foi usado para detectar *B. vogeli* e foi observado que ambos os alvos moleculares demonstraram a mesma sensibilidade (96,15%) e especificidade (99,63%). No entanto, o sequenciamento revelou um falso positivo (*Rangelia* sp.) para o *18S rDNA* que não foi detectado no *hsp70*. Este é o primeiro relatório de um organismo intraeritrocítico intimamente relacionado com o parasita de cães, *Rangelia vitalii*, no Brasil. Na comparação das técnicas *hsp70*-cPCR e *hsp70*-qPCR, 15,66% foram considerados positivos para qPCR, significativamente mais do que foi detectado por cPCR (8,66%). Além da alta conservação do *18S rDNA*, a análise filogenética mostrou que o gene *hsp70* pode organizar as relações entre os piroplasmídeos caninos com maior precisão do que o *18S rDNA*. De acordo com esses achados, o método qPCR possui maior sensibilidade do que o cPCR para detecção de *B. vogeli* em cães naturalmente infectados. O *hsp70*-qPCR teve um limite de detecção de 10 cópias, uma eficiência de 100,30% e um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,998. O desenvolvimento deste qPCR fornece um método altamente sensível e preciso para a detecção molecular de *B. vogeli* e uma ferramenta que é capaz de quantificar o nível de parasitemia em amostras de sangue total de cães. O gene *hsp70* mostrou ser um marcador molecular preciso para a filogenia de *Babesia* spp., especialmente aqueles que infectam cães.

**Palavras Chave:** babesiose canina, proteína de choque térmico 70 kDa

## ABSTRACT

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Comparisons of targets and molecular techniques in the detection of *Babesia vogeli* in dogs and phylogenetic study of the ribosomal region 18S rDNA and the hsp70 gene.** 103p. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

This study aimed to compare the *18S ribosomal DNA (18S rDNA)* and the *heat shock protein 70kDagene (hsp70)* and the techniques conventional PCR (cPCR) and Real time PCR (qPCR) for *B. vogeli* molecular detection in naturally infected dogs. Also was performed a phylogenetic study comparing the two genes for *B. vogeli* classification. Using cPCR of the *18S rDNA* and *hsp70* genes, we were able to detect *B. vogeli* with the same sensitivity (96.15%) and specificity (99.63%). However, the sequencing revealed one false positive (*Rangelia sp*) for *18S rDNA* that was not detected at *hsp70*. This is the first report of an intraerythrocytic organism closely related to the *Rangelia vitalii* parasite of dogs in Brazil. In the *hsp70*-cPCR and *hsp70*-qPCR comparison, 15.66% were considered positive for qPCR, significantly more than was detected by cPCR (8.66%). In addition to high conservation of the *18S rDNA*, the phylogenetic analysis has shown that the *hsp70* gene may organize the relations between canine piroplasmids with more accuracy than *18S rDNA*. According to these findings, the qPCR method has greater sensitivity than cPCR for detection of *B. vogeli* in naturally infected dogs. The *hsp70*-qPCR had a detection limit of 10 copies, an efficiency of 100.30% and a determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.998. The development of this qPCR provides a highly sensitive and accurate method for the molecular detection of *B. vogeli* and a tool that is capable of quantifying the parasitemia level in whole blood samples from dogs. The *hsp70* gene has shown to be a precise molecular marker for phylogeny of *Babesia spp.*, especially those that infect dogs.

Keywords: canine babesiosis; heat shock protein 70 kDa

## 1. INTRODUÇÃO

A babesiose é uma doença antiga com uma vasta distribuição geográfica (Piana & Galli-Valerio, 1895). Também é chamada por um termo genérico que ainda hoje é empregado conhecida como Piroplasmose (Cassini et al. 2009). Esses agentes patogênicos são responsáveis por diferentes graus de patogenicidade em seus hospedeiros, tendendo a apresentar alta mortalidade para animais introduzidos em áreas endêmicas, como também para animais estressados pela ação de outras enfermidades, imunossuprimidos por corticóides ou esplenectomizados (Solano-Gallego et al., 2016). Já foram descritas mais de 70 espécies pertencentes ao gênero *Babesia*, incluindo espécies que acometem o cão como *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* e *B. gibsoni*. Coinfecções de hemoprotozoários e parasitos da ordem *Rickettsiales* são frequentes em animais domésticos. A presença de infecções mistas (que acontece com alguma frequência por partilharem do mesmo vetor) dificulta uma correta diferenciação dos sinais clínicos entre as hemoparasitoses (Irwin, 2009). Nos cães, a infecção pode apresentar diversos sinais clínicos, desde doença subclínica a aguda, caracterizada por febre, anemia hemolítica, icterícia, esplenomegalia, letargia e colapso associados à hemólise intra e extra vascular, hipoxia tecidual, resposta inflamatória, trombocitopenia e pigmentúria (Irwin, 2009). Entretanto, como consequência da inespecificidade das manifestações clínicas e a grande frequência de resultados falsos negativos obtidos a partir do exame citológico é importante o uso de métodos laboratoriais para confirmação do diagnóstico e delineamento do tratamento.

Os métodos moleculares, particularmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), são ferramentas promissoras para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias. No Brasil, a PCR é utilizada mais frequentemente na pesquisa e sua utilidade para o diagnóstico de infecções isoladas e coinfecções por hemoparasitos em cães deveria ser avaliada, porque é considerada um dos métodos de diagnóstico de maior sensibilidade e especificidade.

Os métodos de diagnóstico mais comuns para a babesiose canina são a identificação direta dos trofozoítos/merozoítos dentro dos eritrócitos em esfregaços sanguíneos, métodos sorológicos para detectar anticorpos e amplificação de DNA por PCR (Solano-Gallego et al., 2016). Os métodos moleculares permitem a detecção direta de DNA de hemoparasitas em amostras biológicas, mesmo em condições de parasitemia

muito baixa, condição que é característica de portadores assintomáticos ou animais cronicamente infectados com maior especificidade (Freeman, 2012). Além disso, permite distinção entre diferentes espécies de parasitas (Carret et al., 1999). Da mesma forma, as técnicas moleculares revolucionaram o campo de diagnóstico de doenças parasitas. Vários estudos fizeram comparações entre os métodos mais comuns para detectar patógenos, e muitos deles mostraram que as ferramentas moleculares são mais confiáveis do que outros métodos (Otranto et al., 2011; Kubelová et al., 2013; Mrljak et al., 2017). Existe uma variedade de técnicas moleculares disponíveis, além da PCR convencional (cPCR), como o ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (Müller et al., 2010), PCR em tempo real (qPCR) (Vilela et al., 2013), polimorfismo de comprimento de restrição-PCR (RFLP-PCR) (Carret et al., 1999), PCR aninhada (nPCR) (Ano et al., 2001) e outros. O método qPCR oferece várias vantagens, incluindo a possibilidade de monitorar todos os ciclos da reação em tempo real (Heid et al., 1996). Além disso, é realizada em um sistema de tubo fechado, descartando a manipulação pós-PCR, minimizando o risco de contaminação e resultando em um teste muito mais rápido (Whitcombe et al., 1999). Outra grande diferença é a possibilidade de quantificar os alvos de DNA (Heid et al., 1996). A curva padrão feita de diluições em série do alvo pode ser aplicada para determinar o número da cópia para qualquer amostra desconhecida (Bustin et al., 2009). Existe outra modalidade de PCR capaz de quantificar alvos, a PCR digital; no entanto, até agora, o qPCR é o único método disponível que foi estudado para quantificar alvos de *B. vogeli*.

Apesar de todas essas características excelentes, o sucesso depende do design de oligonucleotídeos iniciadores voltados para marcadores moleculares adequados (LyMBERY e Thompson, 2012). O alvo mais comum usado para diagnosticar a babesiose em todo o mundo é a sequência da subunidade 18 do DNA ribossomal (*18S rDNA*) (Skotarczak, 2008). O DNA ribossômico é muito conservado, e suas sequências são muito úteis na detecção rotineira de genes, mas é importante enfatizar a possibilidade de que as espécies não sejam reconhecidas se a divergência evolutiva ocorreu recentemente (LyMBERY e Thompson, 2012). Considerando a dificuldade de diferenciação de espécies usando o 18SrDNA, outros alvos podem ser usados como uma alternativa, como a proteína citoplasmática 29 kDa, a proteína adesiva relacionada à trombospondina e os genes da proteína de choque térmico 70 kDa (*hsp70*) (Fukumoto et al., 2003; Zhou et al., 2006; Yamasaki et al., 2007). O gene *hsp70* é muito conservado e apresenta maior variabilidade interespecífica quando comparado ao *18S rDNA* em estudos de

filogenética (Yamasaki et al., 2007). A aplicação deste objetivo também foi recomendada para a classificação taxonômica das espécies *Babesia* e *Theileria* (Yamasaki et al., 2007). No entanto, existem apenas algumas sequências do gene *hsp70* de espécies de piroplasma de diferentes partes do mundo, o que pode limitar as análises filogenéticas deste grupo de parasitas.

Este estudo teve como objetivo padronizar e comparar o desempenho de qPCR com a técnica de cPCR com alvo no gene *hsp70* de *B. vogeli* para a detecção desse agente em cães naturalmente infectados, comparando os marcadores moleculares do gene *hsp70* e o *18S rDNA* e realizando um estudo filogenético preliminar comparando o gene *hsp70* com a sequência do 18S do DNA ribossomal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

O gênero *Babesia* foi descrito pela primeira vez por Victor Babès em 1888, que observou pequenas formas no interior de hemácias em esfregaços de sangue de bovinos doentes do delta do Rio Danúbio na Romênia (Babès, 1888). Esses parasitas foram nomeados como *Hematococcus bovis* por Babès. Posteriormente em 1893 no Texas, EUA, Smith e Kilbourne observaram organismos piriformes no interior de eritrócitos de um rebanho doente e relacionaram a ocorrência da doença com a presença de carrapatos. O parasita foi nomeado como *Pyrosoma bovis*. Nesse mesmo ano, Starcovici observou que os protozoários observados por Babès eram os mesmos observados por Smith e Kilbourne e renomeou o gênero como *Babesia* homenageando o descobridor.

Os primeiros relatos de babesiose canina ocorreram na Itália em 1895 (Piana-Galli-Valerio, 1895). Em 1904, foram também identificados piroplasmas em eritrócitos de cavalos na África, provavelmente a espécie atual *Babesia caballi* (Koch, 1906). Em 1910, Patton descreveu, pela primeira vez, piroplasmas pequenos em canídeos na Índia (Patton, 1910) e Nuttal, em canídeos da África (Nuttal, 1910). Atualmente, existem relatos da presença do babesídeos em todo o mundo.

O primeiro relato de babesiose em humanos foi descrito em 1957 na Croácia, em um homem trabalhador campestre esplenectomizado, numa área endêmica de babesiose bovina por *Babesia bovis* (Skrabalo; Deanovi, 1957).

A babesiose canina é causada por várias espécies de *Babesia*, sendo essas predominantemente, *B. canis*, *B. vogeli*, *B. Rossi*, *B. gibsoni*. Antes do advento da reação em cadeia da polimerase, as espécies *B. canis*, *B. vogeli* e *B. Rossi* eram consideradas todas subespécies da *B. canis* devido a sua similaridade morfológica (Passos et al., 2005). Apesar desse ponto em comum, essas espécies assim como a *B. gibsoni* diferem muito em distribuição geográfica, especificidade do vetor, patogenicidade e apresentação clínica o que reforça o conceito de espécies diferentes (Zahler et al., 1998; Depoix et al., 2002, Schoeman, 2009).

### 2.2 Sistema Taxonômico

Os parasitas intraeritrocitários do gênero *Babesia*, *Rangelia* e *Theileria* são geralmente denominadas de piroplasmas devido ao seu formato piriforme quando observadas na microscopia óptica (Irwin, 2009). Em termos taxonômicos, pertencem ao filo Apicomplexa, um antigo ramo da linhagem Eucariota caracterizado pela presença de um complexo apical e um citoesqueleto único (Chauvin et al., 2009) e ordem Piroplasmida que inclui a Família *Babesiidae*, onde se enquadra o gênero *Babesia*, e a família *Theileriidae* que inclui os generos *Theileria*, *Rangelia* e *Cytauxozoon*.

**INFRAFILO Apicomplexa (Levine, 1970)(Cavalier-Smith et al., 2015)**

**SUPERCLASSE Sporozoa (Leuckart, 1879)(Ruggiero et al., 2015)**

**CLASSE Coccidiomorpha (Doflein, 1901)(Ruggiero et al., 2015)**

**SUBCLASSE Hematozoa (Vivier, 1982)(Ruggiero et al., 2015)**

**SUPERORDEMAconoidia (Cavalier-Smith, 2014)(Ruggiero et al., 2015)**

**ORDEM Piroplasmida (Wenyon, 1926)(Ruggiero et al., 2015)**

**FAMILIA Babesiidae (Poche, 1913)(Levine, 1982)**

**GÊNERO *Babesia* (Starcovici, 1893)(Levine, 1982)**

**ESPÉCIE *Babesia vogeli* (Reichenow, 1935)**

### **2.3 Distribuição geográfica**

As espécies desse gênero estão largamente distribuídas pelo mundo todo. A espécie *Babesia canis* se encontra na Europa, a *B. Rossi* está presente no continente africano com relatos na África do Sul, Nigéria e Sudão, a *B. gibsoni* têm casos relatados em vários países inclusive no Brasil, no Rio Grande do Sul (Braccini et al, 1992), São Paulo (Lucidi et al., 2004) e Paraná (Trapp et al, 2006). A *B. vogeli* é a espécie infectante de cães mais distribuída pelo mundo. Existem diversos relatos nas regiões tropicais e subtropicais se estendendo para regiões mais frias aonde pode ser confundida com a *B. canis* (Irwin, 2009).

Existem raros relatos de outras espécies de *Babesia* infectando cães diferente das espécies acima, como por exemplo *B. conradae*, foi descrita na Califórnia nos EUA (Kjemtrup et al., 2006), *B. microti-like(Theileria annae)* reclassificada por Baneth et al. (2015) como *B. vulpes* foi relatada no Noroeste da Espanha (Miró et al., 2015) e na Suécia (Falkenö et al., 2013), *B. caballi*, piroplasmida que infecta equinos foi encontrada em esfregaço sanguíneo proveniente de cão doente na Croácia (Beck et al.,

2009) e também na França (Fritz, 2010). Existem ainda duas *Babesia spp.* consideradas espécies diferentes das já descritas que não nomeadas na América do Norte (Birkenheuer, 2012) e Grã-Bretanha (Solano-Gallego et al., 2016).

Foram também reportados esporadicamente, infecções por *Theileria equi* diagnosticados por PCR, em cães no Brasil (Silva et al., 2006) e na França (Fritz et al., 2010); infecções por *Theileria annulata*, (Criado-formelio et al., 2006).

## 2.4 Morfologia

*Babesia spp.* são morfologicamente classificados como piroplasmas grandes (Medindo 3,0 - 5,0  $\mu\text{m}$ ), ou pequenos (1,5 - 2,5  $\mu\text{m}$ ). *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* são piroplasmas grande (2,4  $\mu\text{m}$  X 5  $\mu\text{m}$ ), piriformes ou ovais que normalmente são encontrados aos pares dentro das hemácias, apresentando oito ou mais merozoítos (Shoeman, 2009). *B. gibsoni* é um piroplasma pequeno (1  $\mu\text{m}$  X 3.2  $\mu\text{m}$ ) comumente observados individualmente em formas circulares ou piriformes (Birkenheuer, 2012).

## 2.5 MEIOS DE TRANSMISSÃO

O meio de transmissão da doença é através da picada do carrapato. Entretanto, para algumas espécies de *Babesia spp.*, como a *B. gibsoni*, acredita-se que a transmissão não está associada somente ao carrapato. Essa transmissão pode ser por contato direto através de brigas (Jefferies et al., 2007; Yeagley et al., 2009), coito ou transmissão transplacentária entre animais infectados e não infectados. Este argumento pode explicar a presença de infecção em áreas onde falta carrapatos para executar a transmissão. As espécies de carrapatos que realizam a transmissão estão associados a localização geográfica, como é evidenciado na tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição geográfica dos agentes patogênicos e dos seus respectivos vetores. Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011.

Agente patogênico	Localização geográfica	Carrapato
<i>Babesia canis</i>	Áreas tropicais e subtropicaisdo mundo todo	<i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Dermacentor marginatus</i>

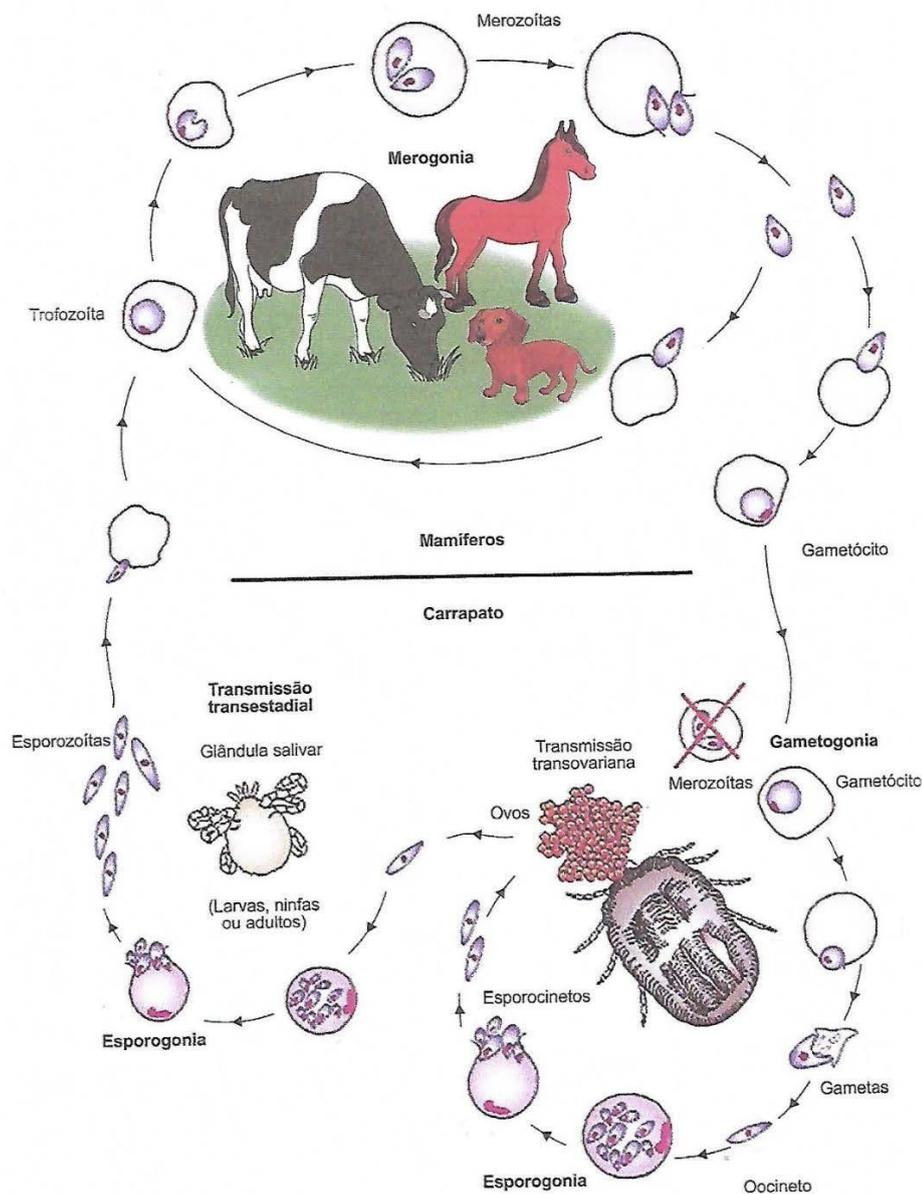
		<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Babesia vogeli</i>	Áreas tropicais e subtropicais do mundo todo	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Babesia rossi</i>	África	<i>Haemaphysalis leachi</i>
<i>Babesia gibsoni</i>	África, Ásia, América do Norte, Europa, Oriente Médio e no sul do Brasil	<i>Haemaphysalis bispinosa</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i>  <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Babesia conrodae</i>	Califórnia, Estados Unidos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> *
<i>Babesia microti-like</i> ( <i>Theileria annae</i> )	Espanha, Croácia, América do Norte	<i>Ixodes hexagonus</i> * <i>Ixodes ricinus</i> ?* <i>R. sanguineus</i>

\*Falta confirmação experimental.

## 2.6 Ciclo de vida do parasita

O ciclo deste parasita no carrapato ocorre de forma similar independente das espécies. Durante o repasto sanguíneos são liberados esporozoítas da glândula salivar dos carrapatos infectados os quais entram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Essas formas infectantes entram por endocitose nos eritrócitos e se transformam em trofozoítas intraeritrocíticos. O trofozoíta inicia o processo de reprodução assexuada também chamada de merogonia. Os merozoítas resultantes desse processo rompem a membrana plasmática das hemácias e infectam novas células. Dentro do novo eritrócito, o merozoíta pode dar início a um novo ciclo de reprodução assexuada ou formar gametócitos masculinos ou femininos. Quando um novo carrapato não infectado subir neste animal para se alimentar, ele ingerirá células sanguíneas infectadas e no trato gastrointestinal do carrapato se iniciará a reprodução sexuada (gametogonia), onde os gametócitos se fundem formando o zigoto. O zigoto se diferencia em uma forma móvel chamada de oocineto que invade o epitélio intestinal onde se inicia a esporogonia. Os

esporocinetos resultantes dessa última fase rompem a célula intestinal e através da hemolinfa são transportados para vários tecidos do carrapato principalmente glândulas salivares e para o ovário onde ocorre a infecção transovariana(Figura 1) (Monteiro et al. 2017).



**Figura 1:** Ciclo biológico de protozoários do gênero *Babesia* spp. (Monteiro, 2017)

## 2.7 Patogênese

A patogênese inicia-se no momento que os esporozoítas se aderem à superfície eritrocitária. As hemácias infectadas incorporam esses organismos por endocitose e este

processo induz a opsonização como resposta imunitária do hospedeiro vertebrado o que estimula a retirada desses eritrócitos pelo sistema mononuclear fagocitário. Desta forma as espécies de *Babesia spp.*, em modo geral, causam uma anemia hemolítica multifatorial (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Como consequência a grande destruição eritrocitária é possível observar hemoglobinúria, hemoglobinemia, bilirrubinúria e bilirrubinemia.

Acredita-se que trombocitopenia nos casos de babesiose está relacionada com a imunidade, sequestrosplênicos e consumo intenso de plaquetas e devido a injúrias no sistema vascular.

O baço tem uma importante função no combate contra a babesiose (Homer et al., 2000). Em casos de animais e até mesmo pessoas esplenectomizadas é observado que a enfermidade tende a ser grave e possui alta fatalidade.

A severidade da babesiose em cães e gatos varia entre infecções subclínicas, anemia moderada até falência múltipla de órgãos e morte (Irwin, 2009).

Fatores relacionados aos hospedeiros vertebrados como idade, raça, nutrição, imunidade e a presença de coinfeção são muito importantes para o prognóstico da doença (Irwin, 2009). A espécie infectante e a sua virulência são fatores relacionados ao parasita que são significativos para o desenvolvimento da infecção.

## **2.8 Sinais Clínicos**

A doença pode manifestar-se sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda e crônica, sendo que filhotes são mais sensíveis e corriqueiramente apresentam as formas mais graves da doença (Breitschwerdt, 1993). Os sintomas mais frequentes são febre, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia, tecidos amarelados a escurecidos. Os sinais clínicos variam de acordo com a espécie infectante e a cepa. O diagnóstico baseado nos sinais clínicos sem a confirmação de testes laboratoriais não é confiável visto que nenhum dos sintomas é patognomônico, pelo contrário, estes podem se apresentar em qualquer doença.

## **2.9 Detecção Laboratorial**

A detecção de *Babesia spp.* foram, durante muito tempo, baseados apenas na morfologia do parasita identificada nos exames citológicos. Essa é uma técnica muito barata, rápida e econômica de detecção. Porém, com os avanços da ciência e o desenvolvimento de formas mais sensíveis e específicas, as inclusões de novos métodos de detecção foram incluídas no processo de conclusão dos casos suspeitos.

### **2.9.1 Exame Citopatológico**

Na rotina clínica o diagnóstico citológico é amplamente utilizado uma vez que a presença de formas evolutivas intracitoplasmáticas pode ser observada em esfregaços de sangue periférico. A citologia ainda é muito utilizada no mundo todo como o primeiro método empregado em casos de suspeita de babesiose. Em estudos epidemiológicos essa técnica é utilizada como um método de triagem. O modo de execução é feito baseada nas buscas de formas intraeritrocitárias no esfregaço sanguíneo. A possibilidade de se encontrar o parasito se eleva muito nos casos agudos, quando a parasitemia é alta, principalmente quando o sangue é obtido a partir da ponta da orelha (O'Dwyer & Massard, 2002). A detecção de formas evolutivas é dificultada em cães com infecções crônicas ou subclínicas, pois nestes casos, a parasitemia é baixa (Boozer & Macintire, 2003). Apesar das grandes vantagens de ser simples, rápida e barata, essa técnica apresenta algumas desvantagens. A microscopia óptica apresenta pouca sensibilidade na detecção do parasita (Vidotto & Trapp, 2004; Dantas-Torres & Figueredo, 2006). Além disso, não é capaz de distinguir espécies e subespécies de *Babesia spp.*

### **2.9.2 Sorologia**

Os testes sorológicos são indicados nos casos os quais é necessário identificar pacientes assintomáticos e detectar infecções crônicas quando o nível de parasitemia geralmente está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico. Apesar, da sorologia ser considerada um método com alta sensibilidade, sua especificidade é considerada de moderada a baixa para detecção de anticorpos contra *Babesia spp.* em cães. Este fato justifica a grande quantidade de reações cruzadas que ocorrem entre *Babesia spp.* e outros hemoparasitas (Zanette et al., 2014). Além disso, falso-negativos podem ocorrer em infecções hiperagudas, visto que os anticorpos só se manifestam com 8 a 10 dias de infecção (Boozer & Macintire, 2003). Outro ponto relevante é que cães tratados contra *Babesia spp.* podem apresentar soropositividade por longos períodos.

Desta forma, é impossível diferenciar infecções agudas e crônicas pela Sorologia (Irwin, 2009). Os testes sorológicos mais empregados são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). A técnica IFI tem sido amplamente indicada como teste sorológico de referência para babesiose por mais de 30 anos (Irwin, 2009). Entretanto, em estudos realizados por Furuta et al. (2009) foi realizada uma comparação entre os testes de ELISA e IFI onde foi observada maior incidência de babesiose no teste de ELISA (67%) que no teste de IFI (59%).

### **2.9.3 Testes moleculares**

A reação em cadeia polimerase (PCR) é um dos testes moleculares mais empregados em confirmações de diagnósticos feitos pelo mundo. O seu desenvolvimento é considerado uma grande revolução tecnológica que impactou uma série de mudanças na ciência e nos métodos diagnósticos de doenças infecciosas. Essa técnica é baseada na replicação enzimática *in vitro* de sequências específicas do DNA alvo que são guiadas por iniciadores oligonucleotídeos, conhecidos como primers, resultando na geração de um número exponencial de cópias dessas sequências. Essa técnica foi desenvolvida na Cetus Corporation, Califórnia, pelo Dr. Kary Mullis em 1983. A reação de cadeia polimerase consiste em ciclos repetidos de desnaturação das fitas duplas de DNA, hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores nos alvos de fita simples e a confecção de uma nova fita complementar por uma DNA polimerase (Verlengia, 2013).

A característica singular de produção exponencial de produtos específicos por meio de ciclos repetidos confere alta sensibilidade à técnica, viabilizando a detecção de quantidades muito pequenas de DNA. Além disso, o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada finalidade garante a alta especificidade da técnica. Essas peculiaridades da PCR associadas as mais variadas modificações e inovações agregadas ao modelo original ao longo dos anos têm expandido as fronteiras do campo de aplicação da reação de cadeia polimerase (Verlengia, 2013).

As técnicas de biologia molecular têm assumido grande importância na detecção de várias espécies de microrganismos em vetores e hospedeiros. A reação em cadeia da polimerase está facilitando o diagnóstico das doenças infecciosas e tem auxiliado na

classificação taxonômica destes e de outros agentes. A PCR teve grande impacto na história da classificação taxonômica de *Babesia spp.* que acometem os cães.

O primeiro relato da literatura que explicita a infecção por *Babesia spp.* em cães foi feita por Piana e Galli-Valerio (1895). Posteriormente, em 1935, Reichenow observou diferenças sutis na morfologia de *Babesia spp.* que infectavam os cães observados por ele quando comparados com a clássica cepa europeia *B. canis* e decidiu nomear como uma nova espécie chamada de *B. major*. Entretanto, esse termo já está sendo utilizado e, em 1937, Reichenow renomeou a espécie como *B. vogeli*. Apesar do termo ter sido criado, o mesmo foi evitado por muitos anos porque faltavam evidências que alicerçassem o fato de serem duas espécies diferentes. O mesmo ocorreu com a espécie *B. rossi*, descrita pela primeira vez como *Piroplasma rossi* por Nuttall (1910). Por esse motivo, Uilenberg et al. (1989) propôs a divisão da espécie *B. canis* em três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* (Reichenow, 1935) e *B. canis rossi* (Nuttall, 1910). Com o advento das técnicas moleculares, a discussão sobre o sistema taxonômico dessas espécies voltou a ser pauta. Apesar da introdução desses novos dados, essas espécies permaneceram até recentemente como subespécies da *B. canis*. Com as inovações na PCR e os estudos filogenéticos surgiram novos dados baseados nas sequências genéticas de cada parasita agregando novas evidências na diferenciação das três espécies (Carret et al., 1999; Passos et al., 2005).

Além de trazer novos dados genéticos importantes para taxonomia, a PCR se mostra uma ferramenta promissora para detecção do parasita em amostras clínicas (Birkenheuer et al., 2003a). Birkenheuer et al. (2003b) afirmam que para se estabelecer o correto prognóstico e delinear a terapêutica mais adequada é essencial a determinação de qual genótipo está causando a infecção. Em adição, a PCR pode ser usada para monitorar o tratamento da doença.

Ao longo, dos anos muitas variáveis da PCR foram utilizadas nos estudos moleculares de *Babesia spp.* A PCR convencional foi amplamente explorada, essa reação foi associada a digestão por enzimas de restrição em uma técnica chamada Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) usada para a diferenciação das espécies *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* (Solano-Gallego et al., 2008). Além dessas duas variações já existem reações tipo Nested e Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) usadas para detecção dessas espécies (Müller et al. 2010). Essas variações

trazem vantagens como maior rapidez e especificidade em suas detecções (Birkenheuer et al. 2003; Ikadai et al., 2004). Em adição à PCR, existe outro método molecular descrito em estudos epidemiológicos de hemoparasitoses em cães e gatos chamado de Reverse-line blot (RLB) Hybridisation (Georges et al., 2008)

Os alvos mais comumente utilizados são regiões muito conservadas como as subunidades nucleares ribossomais 18S, 5.8S e 28S (18S, 5.8, 28S rDNA) e duas regiões de espaços transcritos internos (ITS1 e ITS2). Também existem relatos do uso de outros alvos como para proteína citoplasmática 29kDa, p18 e BgTRAP (Fukumoto et al., 2001; Fukumoto et al., 2003; Zhou et al., 2006) O gene codificante da proteína de choque térmica 70kDa (*hsp70*) tem sido usado como alternativa para detecção de *Babesia spp.* (Izzi et al. 2013). Esse gene também tem sido empregado em estudos filogenéticos das espécies de *Babesia spp.* (Yamasaki et al. 2007).

O gene *hsp70* faz parte de uma família multigênica conservada presente em procaríotos e eucariotos (Jie et al., 1996). As *hsp70* são proteínas menores que tem diversas funções celulares atuando principalmente como chaperona o enovelamento e transporte de proteínas recém-sintetizadas, desagregação de proteínas agregadas, translocação membranar de proteínas secretoras e controle da atividade de reguladores (Mayer & Bukau, 2005). Além disso são fundamentais em situações de sobrevivência quando as células são expostas a altas temperaturas ou a um grande número de danos (Kaufman, 1990). Em patógenos como *Plasmodium spp.*, *Trypanosomas spp.* e *Leishmaniaspp.*,foi sugerido que a proteína *hsp70* tem uma participação crucial na sobrevivência e proliferação no hospedeiro (Lindquist, 1996). Em estudos realizados por Van der Ploeg (1985) sugeriram que diferença de temperatura entre hospedeiros de protozoários parasitas, como por exemplo, carrapatos e bovinos pode induzir uma resposta de choque térmico nesses organismos. Devido a essa grande importância na sobrevivência do parasita, o gene é bastante conservado. Esse fato foi evidenciado em espécies da ordem *Piroplasmida* por um estudo realizado por Yamasaki et al. (2002).

Yamasaki et al. (2007) fez um estudo comparativo entre dois alvos muito conservados em protozoários, o *18S rDNA* e o gene *hsp70* no qual foi relatado que o gene *hsp70* tem uma maior variabilidade entre as espécies *Babesia spp.* que *18S rDNA*. Adicionalmente foi feito um estudo filogenético para cada alvo e seus resultados foram comparados. Os resultados sugerem que a análise filogenética baseada no gene *hsp70*

pode ser de grande valia na classificação das espécies de *Babesia spp.* e também nas espécies de *Theileria sp.*

### **2.9.3.1 Sequenciamento**

A técnica de sequenciamento é sempre empregada para a análise detalhada de um determinado gene ou confirmação da detecção de uma espécie (Oyamada et al., 2005). O método de sequenciamento de DNA mais utilizado é baseado no método de Sanger, desenvolvido em 1977, também conhecido como método de terminação de cadeia com didesoxirribonucleotídeo trifosfato (ddNTPs), que permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. Neste mesmo ano, surgiu um segundo método de sequenciamento desenvolvido por Maxam e Gilbert conhecido como método de degradação química. Este método foi bastante utilizado inicialmente, porém o método de Sanger foi considerado mais simples e confere a escolha do uso de diferentes DNA polimerases quando comparado com o método de Maxam e Gilbert. Por esse motivo, esse método de Sanger é utilizado em larga escala hoje em dia, enquanto o sequenciamento de Maxam e Gilbert está desuso.

Atualmente o método de Sanger é automatizado, feito em máquinas que podem sequenciar 96 sequências diferentes de 500-800 pares de base ao mesmo tempo em algumas horas. A técnica se assemelha ao da PCR convencional. O processo consiste na repetição de vários ciclos onde ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA, hibridização do oligonucleotídeos as fitase inclusão de ddNTPs por uma DNA polimerase. Os produtos da reação serão analisados posteriormente por um sequenciador automático (Zaha et al., 2014).

### **2.9.3.2 Filogenia**

A filogenia, também chamada de filogênese, é o termo utilizado para a criação de hipóteses de relações evolutivas, ou seja, relações filogênicas, de um grupo de organismos. Em outras palavras, pode ser definida como uma ciência que visa determinar as relações ancestrais entre espécies conhecidas. Esse conceito surgiu com a teoria de Darwin e é baseada na ancestralidade entre espécies.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento, foi possível realizar comparações filogenéticas moleculares entre espécies por meio da

construção de árvores filogenéticas e a medição da distância genética entre os indivíduos.

As regiões que codificam a subunidade ribossomal (rDNA) são muito conservadas mesmo após de bilhões de anos de processo evolutivo. Baseado nesse fato, essas regiões são muito utilizadas como alvos para estudos filogenéticos (Woose & Fox, 1977). Apesar dessas sequencias ribossômicas serem muito utilizadas na rotina, é importante ressaltar que espécies podem não ser reconhecidas se a divergência ocorreu recentemente (Fox et al., 1992; Borchiellini et al., 1998) Por isso é ideal que a análise filogenética seja realizada em múltiplos genes em adição ao rDNA (Yamasaki et al., 2007).

Muitos estudos filogenéticos foram realizados em busca do ancestral comum dos protozoários como *Babesia spp.* e *Theileria spp.* (Kjemtrup et al., 2000; , Inokuma et al., 2003; Yamasaki et al., 2007).

A família de proteínas *hsp70* constitui um dos grupos mais conservado conhecido que é encontrado em todas as espécies. No passado, 8-10 anos atrás, por causa da importância percebida das proteínas *hsp70* na estrutura celular e na sua função, o gene *hsp70* foi sequenciado a partir de um grande número de indivíduos procarióticos e eucarióticos (Borchiellini et al., 1998).

Desta maneira, uma análise do gene *hsp70* de indivíduos da ordem *Piroplasmidae* seria de grande valia na classificação filogenética.

## 2.10 Tratamento

O tratamento da doença se baseia na eliminação do parasita, transfusões sanguíneas e terapia de suporte (Schoeman, 2009).

As espécies *B. canis*, *B. rossi* e *B. vogeli* são tratadas eficientemente com aceturato de diminazeno ou dipropionato de imidocarb. Esses são os fármacos mais utilizados no Brasil (Dantas-Torres, 2006).

Entretanto, para a espécie *B. gibsoni*, o aceturato de diminazeno não é eficiente para eliminar os parasitas (Suzuki et al. 2007). A anfotericina B exibe ação contra *B. gibsoni*, mas *in vitro* causou dano oxidativo em eritrócitos e *in vivo* causou reações

adversas nos rins sem a eliminação completa do organismo (Yamasaki et al. 2014) Birkenheuer et al. (2004) relataram que a combinação de atovaquona com azitromicina foi eficaz na eliminação/diminuição dos números de parasitas abaixo dos limites de detecção molecular sem reações adversas na maioria dos cães. No entanto, o uso isolado de atovaquona não é suficiente no tratamento da doença resultando em recidivas e resistência (Matsuu et al. 2004).

### **2.11 Importância em saúde pública**

A babesiose canina não causa problemas de saúde pública aparentes. Os riscos de transmissão zoonótica em pessoas imunocompetentes é desconhecido, porém representam um risco potencial para pessoas aidéticas ou que enfrentam tratamentos para câncer principalmente (Solano-Galego et al. 2016). Pessoas que realizaram a remoção total ou parcial do baço são relevantemente mais sensíveis que pessoas com o órgão íntegro. A babesiose humana é uma zoonose rara reportada nos Estados Unidos e Europa (Solano-Galego et al. 2016). A maioria dos casos foram leves a assintomáticos, porém pessoas esplenectomizadas foram a óbito. Existem também casos severos causados pela espécie *B. divergens* reportados em pessoas esplenectomizadas que levaram essas pessoas ao óbito.

### **2.12 Profilaxia**

A prevenção da doença tem como foco principal o controle de vetores nos animais e no ambiente (Irwin, 2009). A profilaxia pode ser feita com o uso de carrapaticidas e limpeza do ambiente (Dantas-Torres, 2006). Para que esse processo tenha sucesso é necessário a inspeção do animal seja feita regularmente em busca de carrapatos e controle do ambiente deve ser feito rigorosamente. Além disso, é fundamental que animais que serão transportados para áreas endêmicas recebam uma dose preventiva de parasiticida antes de serem transportados.

Uma prática comum no atendimento clínico é a doação de sangue para pacientes necessitados. Como prática geral de prevenção de doenças é primordial o teste desse sangue doado para hemoparasitos. Assim pode-se evitar a disseminação de enfermidades como a babesiose.

Existem algumas vacinas comerciais para prevenção de babesiose causada pela espécie *B. canis*. Na Europa, existe uma vacina conhecida como Pirodog® (Merial)(Solano-Gallego et al, 2016). Outro exemplo existe na África do Sul, uma vacina contra *B. Rossi* (Nobivac Piro®) (Schoeman, 2009). Ambas induzem uma proteção parcial para animais recentemente expostos ao parasita. As vacinas são capazes de diminuir como também suavizar os sintomas clínicos.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Determinação do Controle positivo

O sangue controle positivo foi obtido de um cão sintomático com inclusões intraeritrocitárias observada no exame citológico como evidenciado na Figura 2.



**Figura 2.** Inclusões intraeritrocitárias ovaladas de *Babesia vogeli*, encontradas durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X. (Escala: 20μm).

Em seguida, o DNA Extraído foi extraído do sangue total e foi submetido à PCR convencional descrita por Carret et al. (1998) a qual amplifica um fragmento de 400pb da região *18S rDNA* de *B. vogeli*. Água livre de Nuclease (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e sangue de cão nunca exposto a carrapatos foram usados como controle negativo.

O fragmento foi purificado com CleanSweep (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e sequenciado. A sequência obteve 100% de identidade com *B. vogeli* e foi depositada no GenBank com o número de acesso MF459002.

Essa amostra foi submetida a *hsp70*-qPCR desenvolvida neste estudo e mostrou o valor de ciclo de quantificação igual a 29.81 ciclos, mostrando ter aproximadamente 100 cópias do gene *hsp70*.

### **3.2 Amostragem**

Um total de 300 amostras de sangue foram coletadas de cães domésticos domiciliados nos municípios de Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba no estado do Rio de Janeiro, através de venopunção cefálica, e alocadas em tubos estéreis contendo ácido etileno-amino-tetracético (EDTA). Essas amostras foram utilizadas com o objetivo de determinar o desempenho da *hsp70*-qPCR comparada à *hsp70*-cPCR, comparar a sensibilidade e especificidade dos genes *hsp70*-cPCR com *18SrDNA*-cPCR.

As amostras de sangue foram aliqüotadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA total.

### **3.3 Extração do DNA genômico, quantificação e pureza**

O DNA total das amostras de sangue foi extraído conforme protocolo do fabricante do Kit DNeasy Tissue (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) para extração de DNA. A concentração de DNA total nas amostras foi determinada por fluorimetria no aparelho Qubit utilizando o kit dsDNA BR Assay. As amostras extraídas serão ajustadas para uma concentração de 100ng/uL e três alíquotas serão preservadas em freezer -80°C até o momento das análises.

### **3.4 Desenvolvimento e otimização da reação em cadeia da polimerase**

#### **3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos**

As sequências de DNA dos genes *hsp70* de diferentes espécies de *Babesia spp.* e *Theileria spp.* assim como outros hemoparasitos de cão (ex. *Hepatozoon canis*, *Rangelia vitalii*) foram recuperados a partir do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e foram acrescentadas ao alinhamento para a escolha de regiões específicas de *B. vogeli*. Os oligonucleotídeos foram desenhados para

as regiões alvos no software Primer Express® 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). As características dos oligonucleotídeos foram testadas usando o software Oligo Explorer 1.2 e a especificidade dos mesmos foi testada através da ferramenta primerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/e>), do software FastPCR (Kalendar et al. 2017) e através do alinhamento de sequências de DNA no programa MEGA 7.0.

### 3.4.2 As reações

As amostras de DNA dos cães foram submetidas à amplificação do gene *hsp70e* da região ribossomal *18S rDNA* de *B. vogeli*. O protocolo das reações foi otimizado no Laboratório de Sanidade Avícola. A concentração de cada reagente na reação foi otimizada a partir da realização de vários testes com concentrações diversas. O propósito deste procedimento foi determinar a concentração mínima de cada reagente para a obtenção de resultados satisfatórios utilizando um DNA padrão como controle positivo.

### 3.4.3 Padronização da PCR convencional

Foram realizados vários testes para otimização e padronização da reação proposta nesse estudo. Os oligonucleotídeos iniciadores senso (5'GGACGTTGCTCCCCTCTCA-3') e antisense (5'GCTGACCTCAGAAGCG TCAA-3') foram testados em diferentes concentrações (200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM). Em seguida foi testado a concentração de Magnésio (1,5mM, 2mM, 2,5mM, 3mM, 4mM), as concentrações de dNTPs (200nM, 300nM, 400nM), as concentrações de TAQ (0,5U, 1U, 1,25U, 1,5U) e por último a concentração de DNA (100ng/μL, 200ng/μl, 300μL). As reações foram padronizadas em volume final de 25μL contendo: 0,5 U de TAQ DNA polimerase Invitrogen®; 1x Tampão (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) (cada); 0,2 μM de oligonucleotídeos (cada) e 300ng/μL de DNA total extraído de sangue de cão. Água livre de Nuclease (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)) foi usada como controle negativo.

As condições de termociclagem foram otimizadas no equipamento Veriti® (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) . Para determinar a temperatura ótima de anelamento dos primers um PCR com gradiente de

temperatura foi realizado tomando como referência a temperatura média de dissociação dos primers com variação de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Os tempos de desnaturação, anelamento/extensão foram norteados com base no tamanho do produto de PCR e no seu conteúdo de CG. As condições de termociclagem foram padronizadas em três estágios: primeiro estágio:  $94^{\circ}\text{C}$  por 3min segundo estágio: 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30s,  $60^{\circ}\text{C}$  por 30s e  $72^{\circ}\text{C}$  por 40s e terceiro estágio:  $72^{\circ}\text{C}$  por 5min. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão de corrida TAE, durante 60 minutos, a 5V/cm. Os géis foram corados em brometo de etídeo e visualização dos produtos amplificados sob luz UV, através de transiluminador (Eletronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH®)

#### 3.4.4. Padronização da PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores selecionados amplificaram um fragmento de 118pb do gene *Hsp70* de *B. vogeli*: senso BvqF (5'-GCTGGTGACACCCACCTT-3') e anti-senso BvqR (5'-CAACAAGCGTGCCCTCC-3'). A sonda desenhada foi a Bvq (5'-NED-CCTCCTCGTTGAGCACT-MGB-3'). Para otimizar as concentrações de primers e sonda foram geradas curvas padrões utilizando o DNA de controle positivo como um molde. Uma matriz de concentração foi realizada para determinar a concentração de primer mínima ideal necessária para obter o menor ciclo de quantificação ( $C_q$ ) com sinal máximo de fluorescência de acordo com a linha de base ( $\Delta R_n$ ) e ausência de picos inespecíficos de temperatura de dissociação em comparação com o controle positivo. Um experimento foi realizado com três repetições de cada uma das 16 condições estabelecidos para o teste de concentração de acordo com protocolo comercial como é possível observar na Tabela 2.

**Tabela 2.** Combinações das concentrações de oligoiniciadores para otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de *Babesia vogeli*.

Oligonucleotídeo iniciador		Anti-senso			
		200 Nm	400 Nm	600 Nm	800 Nm
Senso	200 nM	200/200 Nm	200/400 Nm	200/600 Nm	200/800 Nm
	400 nM	400/200 Nm	400/400 Nm	400/600 Nm	400/800 Nm

<b>600 nM</b>	600/200 Nm	600/400 Nm	600/600 Nm	600/800 Nm
<b>800nM</b>	800/200 Nm	800/400 Nm	800/600 Nm	800/800 Nm

As reações foram executadas em um volume total de 12µl, compreendendo: 1x 1X Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e 3µl (100ng/µL) de DNA de *B. vogeli* utilizando as seguintes condições de termociclagem: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 20s, 60°C durante 1min. Uma curva de dissociação foi gerada para verificar a especificidade das amplificações e a formação de dímeros. .

Após a padronização das concentrações de primers, a concentração ótima sonda foi determinada. A sonda foi marcada na extremidade 5' com o “repórter-dye” NED e na extremidade 3' com o “quencher” minor groove binder (MGB). Ensaios de sonda foram executados com 3 repetições para cada concentração (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM e 250 nM).A PCR para determinar a concentraçãoótima da sonda foi realizada em um volume final de 12µl, compreendendo 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 800 nM de cada iniciador, 3µl (100ng/µl) de DNA de *B. vogeli*, e a respectiva concentração da sonda. A seleção da concentração ótima de sonda para a qPCR foi baseada no resultado de menor *Cq* e máximo  $\Delta Rn$  obtidos no ensaio de detecção do alvo.

### 3.4.5 Cuidados para evitar contaminações

Para evitar problemas de contaminação, os processos de extração do DNA, preparo do mix de reagentes, adição do DNA as reações e eletroforese em gel de agarose seguido de visualização dos resultados foram realizados em ambientes diferentes respeitando um fluxo unidirecional. Além disso, o preparo da mistura da PCR foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (Trox® technik) utilizando um conjunto diferente de pipetas de precisão e de ponteiros descartáveis com filtro e estéreis (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

### 3.5 PCR convencional com alvo na região ribossomal 18S rDNA

As mesmas amostras testadas pela cPCR com alvo no *hsp70* foram submetidas a cPCR, baseado na descrição de Martin et al. (2006) usando oligonucleotídeos

iniciadores com alvo no gene *18S rDNA*. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose a 2%. A eletroforese teve duração de 60 minutos a 75 volts (5V/cm), em seguida os géis foram corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

### 3.6 Avaliação do desempenho da técnica

#### 3.6.1 Análise da especificidade analítica da técnica

A especificidade do ensaio foi analisada usando material genético de outros hemoparasitas transmitidos por carrapatos tais quais: *Babesia bovis*, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Rangelia vitalii*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*.

A espécie *A. phagocytophilum* foi obtida a partir de cultura celular. O DNA de *A. phagocytophilum* foi submetido a qPCR (Santos et al., 2011), e através desta técnica foi quantificado de acordo com a equação gerada pela curva padrão [ $f(x) = -3,38x + 37,52$ ], considerando o Cq 18,77, totalizando 352644,63 cópias.

A amostra positiva para *E. canis* também foi submetida a reação de qPCR (Baneth et al., 2009), e através desta técnica foi quantificado de acordo com a equação gerada pela curva padrão [ $f(x) = -4,74x + 50,84$ ], considerando o Cq 21,10, totalizando 1880449,19 cópias.

O DNA de *A. marginale* e *B. bovis* foram obtidos a partir de amostras de sangue proveniente de um bovino naturalmente infectado; *A. platys* e *H. canis* obtidos de amostras de sangue de cães naturalmente infectados (Da Silva et al. 2016; Otranto et al., 2011); *R. vitalli* foi obtida de um cão naturalmente infectado (Lemos et al. 2012); *B. caballi* e *T. equi* foram obtidos de uma amostra de sangue de equino naturalmente infectado (Kim et al., 2008). Todas as amostras de sangue foram obtidas de animais com alta parasitemia, em fase aguda, com infecção diagnosticada através de microscopia e confirmada através de ensaio molecular específico.

Análise “*in silico*” usando o algoritmo primerBLAST (NCBI, Bethesda DM, EUA) como ferramenta, permitiu observar que os oligoiniciadores desenhados nesse estudo não foram específicos para o DNA de *B. canis*, *B. rossi*, *B. gibsoni*, *B. vulpes*, *B.*

*conrodae*, *Hepatozoon americanum* do cão, além de outras espécies como *B. divergens* e *B. bigemina*.

### 3.8.2 Análise da sensibilidade analítica da técnica

A sensibilidade analítica da qPCR foi avaliada através do uso de diluições decimais seriadas do amplicon. Foram delineados novos primers limitantes de uma região maior que continha o fragmento-alvo ao centro. O produto dessa PCR foi purificado e submetido a reação desenvolvida neste estudo. Esse produto também foi purificado e quantificado. Para determinar o número de cópias de cada ponto da diluição foi imprescindível realizar o cálculo de estimativa conforme a equação a seguir:

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{cópias por mol}) \times \text{Concentração de DNA (g)}}{\text{tamanho do alvo (pares de base)} \times 660 (\text{g/mol/bp})}$$

O número de cópias variou de 1 a  $1 \times 10^6$  por  $\mu\text{L}$ , com sete séries de diluições separadas realizadas para cada ponto da curva em triplicata. A regressão linear, juntamente com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) formado após a determinação de cada ponto da curva, pode ser utilizado para avaliar se o ensaio de qPCR foi otimizado. A eficiência de cada reação foi determinada considerando o *slope* da curva padrão usando a seguinte fórmula: [Eficiência =  $10^{(-1/\text{slope})} - 1$ ] (SVEC et al., 2015).

### 3.8 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR para sequenciamento

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o kit CleanSweep (Applied Biosystems®) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram conservadas a  $-20^\circ\text{C}$  até a próxima etapa.

### 3.9 Sequenciamento e análise filogenética

Todas as amostras positivas foram purificadas e sequenciadas para o gene *hsp70* e *18S rDNA* pelo método Sanger (Sanger et al, 1977). O sequenciamento foi realizado utilizando o método de Sanger com equipamento de análise de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, CA, EUA) (Sanger et al., 1977). O algoritmo BLAST disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizado para avaliar a identidade das seqüência fornecidas pelo sequenciamento. As sequencias obtidas nesse estudo foram alinhadas com outras sequencias da ordem piroplasmida presentes no

GenBank para o gene *hsp70* usando o algoritmo Clustal W no programa MEGA 7.0. A reconstrução filogenética foi realizada com base no método de máxima verossimilhança e a distância entre os pares foi calculada com o modelo de substituição de nucleotídeo GTR + G + I para o gene *hsp70* e os parâmetros de Kimura-2 para sequências de *18S rDNA* (Tamura et al., 2013). Os modelos foram selecionados com base no critério de informação de Akaike (AIC), corrigido com o ModelTest no software CLC Main Workbench 7.8.1 (Posada e Crandall, 1998). Para análise de confiança dos grupos, utilizamos um teste bootstrap com 1000 pseudoreplicados. As sequências *18S rDNA* (AY963172) e *hsp70* (AJ243513) de *Plasmodium berghei* foram utilizadas como outgroups para análises filogenéticas. Essas análises foram realizadas usando o software MEGA 7.0 (Tamura et al., 2013).

### **3.10 Análise estatística**

O teste de McNemar a um nível de significância de 5% foi usado para medir as proporções de desacordo entre qPCR e cPCR visando o gene *hsp70* e avaliar o desempenho do DNA de 18S e genes *hsp70* usando cPCR para detecção molecular de *B. vogeli* (Medronho, 2009). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

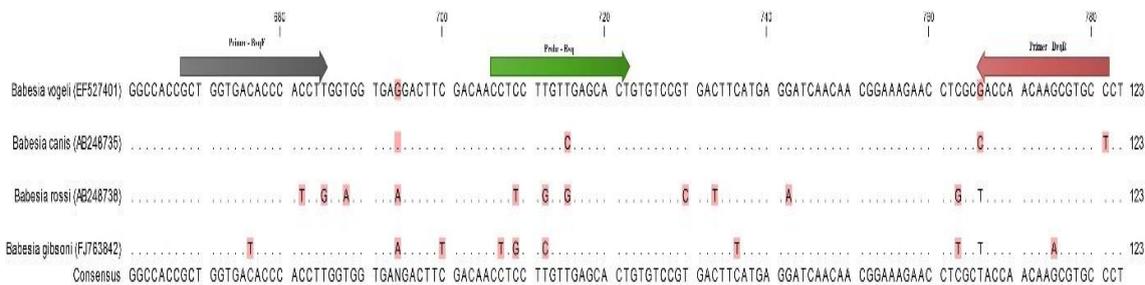
### **3.11 Considerações éticas**

Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ (CEUA-UFRRJ) sob o número 3915240616.

## **4. RESULTADOS**

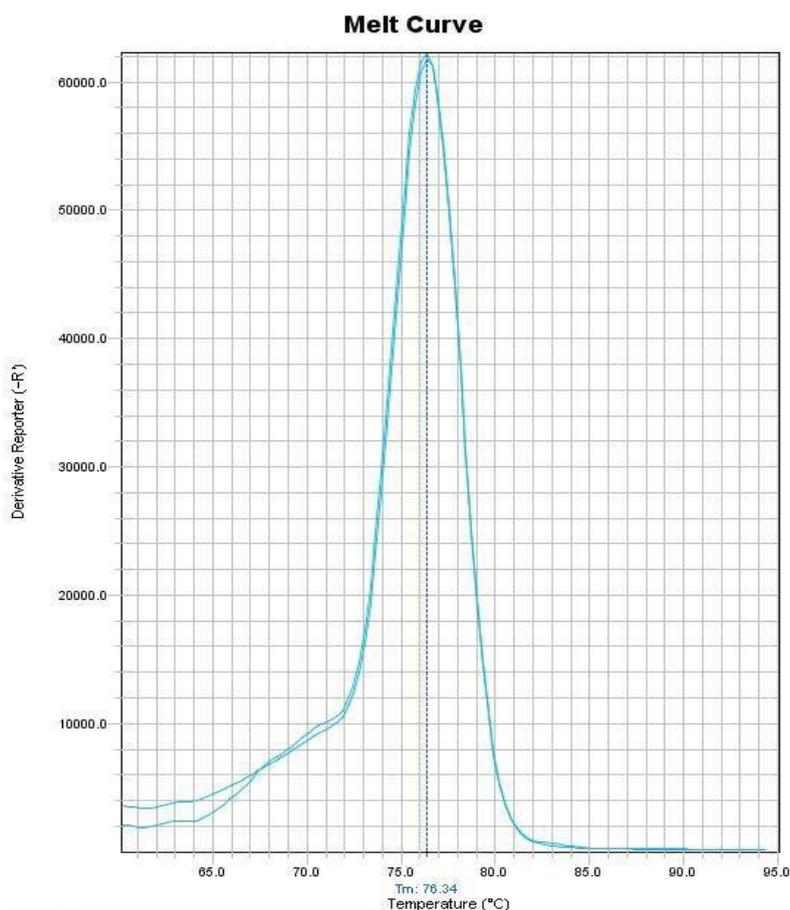
O software Oligo Analyzer mostrou pouca força de atração entre os iniciadores e sonda e ausência de auto-dimerização durante a análise das características apresentadas pelos oligonucleotídeos desenhados para qPCR.

Os iniciadores e a sonda foram projetados para amplificar especificamente *B. vogeli*. A sonda (que tem alta estringência) se liga especificamente apenas à sequência de *B. vogeli*, assim como o iniciador reverso (Figura 3).



**Figura 3.** Alinhamento das espécies de *Babesia* que acometem os cães.

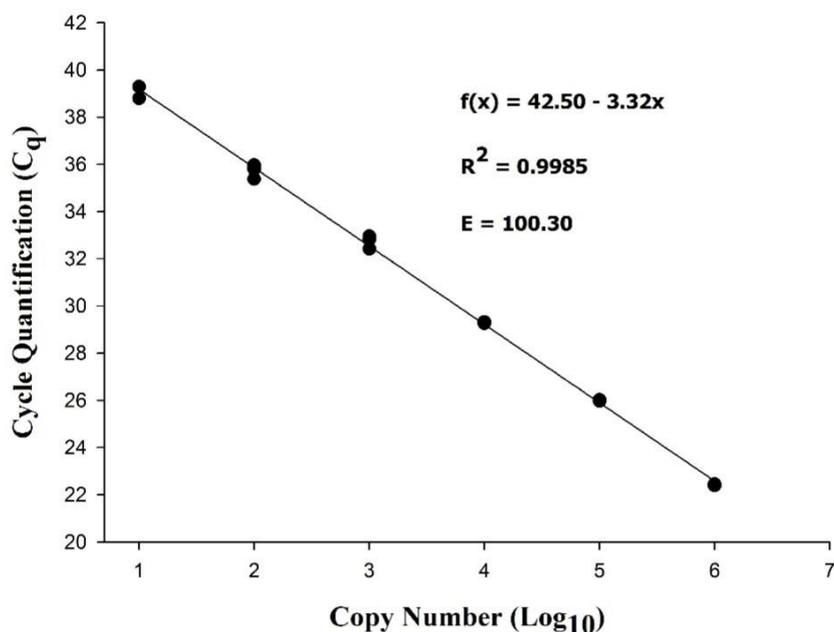
O ensaio do SYBR green proporcionou a concentração ideal para os iniciadores BvqF e BvqR a 800 nM, que atingiu um Cq de 27,77 ciclos no controle positivo e  $\Delta Rn$  (1,886). Ao verificarmos a curva de dissociação observou-se que nesta concentração não ocorreu nenhum pico de dimerização, como pode ser observado na Figura 3. A concentração ideal da sonda foi de 250 nM, atingindo um valor Cq médio de 27,77 ciclos no controle positivo e um  $\Delta Rn$  maior com o mínimo Cq.



**Figura 4:** Curva de dissociação do fragmento de 118 pares de base do gene *hsp70* de *Babesia vogeli* amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo

real (qPCR) utilizando oligonucleotídeos na concentração de 800nM.

A curva padrão criada mostrou um limite de detecção de 10 cópias de alvo contendo o gene *hsp70* de *B. vogeli* (Figura 5). O coeficiente de determinação foi 0,998, o que é muito próximo do ótimo ideal teórico 1,0. A eficiência da reação foi de 100.30%, que está dentro da faixa fornecida pelas diretrizes da Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE). Os seis pontos de diluição testados apresentaram um Cq variando de 21,64 ciclos na primeira diluição (1 x 10<sup>6</sup> cópias de alvos) para 38,26 ciclos na última diluição (10 cópias de alvos) (Figura 5). Portanto, este ensaio pode ser usado para estimar o número de cópias do gene e, por extensão, a porcentagem de parasitemia em amostras clínicas.



**Figura 5.** Curva padrão plotada a partir de diluições decimais em série do amplicon, contendo o gene *hsp70* de *Babesia vogeli*. O valor do ciclo de quantificação (Cq) obtido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real usando a tecnologia TaqMan foi plotado como uma função do número inicial de cópias alvo.

Quando outros patógenos foram testados, apenas *B. vogeli* foi amplificado. Em todos os ensaios de especificidade utilizando outros agentes patogênicos foram usados controles padrão com abundância de microrganismos.

Em relação ao cPCR desenvolvido neste estudo com alvo gene *hsp70*, as

condições de termociclagem padronizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 10min; 40 ciclos de 95°C por 60s, 60°C por 30s e 72°C por 45s; anelamento final a 72°C por 3min. a reação final foi padronizada em um volume total de 25 µL, contendo: 0,2 µM de oligonucleotídeos (cada), dNTPs 0,2 mM, 1x tampão de polimerase de DNA, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de DNA polimerase e 100 ng / µL de DNA extraído de sangue total de cachorro. O limite de detecção foi de 100 cópias de genes. Quando o ensaio de especificidade foi realizado, apenas *B. vogeli* foi amplificado. O cPCR descrito anteriormente com alvo no *18S rDNA* também mostrou um limite de detecção de 100 cópias.

Quando o método *hsp70*-qPCR foi aplicado às amostras, 15,66% (n = 47/300) foram positivos, enquanto apenas 8,66% (n = 26/300) foram positivos ao usar *hsp70*-cPCR. O valor médio de C<sub>q</sub> observado em amostras positivas foi de 30,05, variando de 21,81 a 38,29 ciclos. De acordo com a equação gerada pela curva padrão, a faixa dinâmica linear de cópias de *B. vogeli* variou de 18,92 a 1,919,254,33 cópias com valores C<sub>q</sub> de 38,26 e 21,64, respectivamente. Todas as amostras positivas no *hsp70*-cPCR foram positivas ao usar *hsp70*-qPCR. No entanto, *hsp70*-cPCR não detectou o fragmento alvo em 44,68% (n = 21/47) das amostras positivas identificadas usando *hsp70*-qPCR. O teste de McNemar mostrou uma diferença significativa com um valor de p < 0,0001 favorecendo qPCR (Tabela 1). A sensibilidade e especificidade de *hsp70*-qPCR em relação à detecção de *B. vogeli* por *hsp70*-cPCR foi de 100%. No entanto, o valor preditivo positivo (PPV) e o valor preditivo negativo (NPV) do teste *hsp70*-qPCR em relação à detecção *B. vogeli* pelo teste *hsp70*-cPCR foram 55,32% e 100%, respectivamente.

**Tabela 3.** Análise dos pares discordantes entre os resultados da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) com base no gene da proteína de choque térmico 70 kDa (*hsp70*) para detecção molecular de *Babesia vogeli* em cães.

cPCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	26	0*	26
Negativo	21*	253	274

\*p < 0.0001 indica desacordo significativo entre *hsp70*-cPCR e *hsp70*-qPCR pelo teste de McNemar.

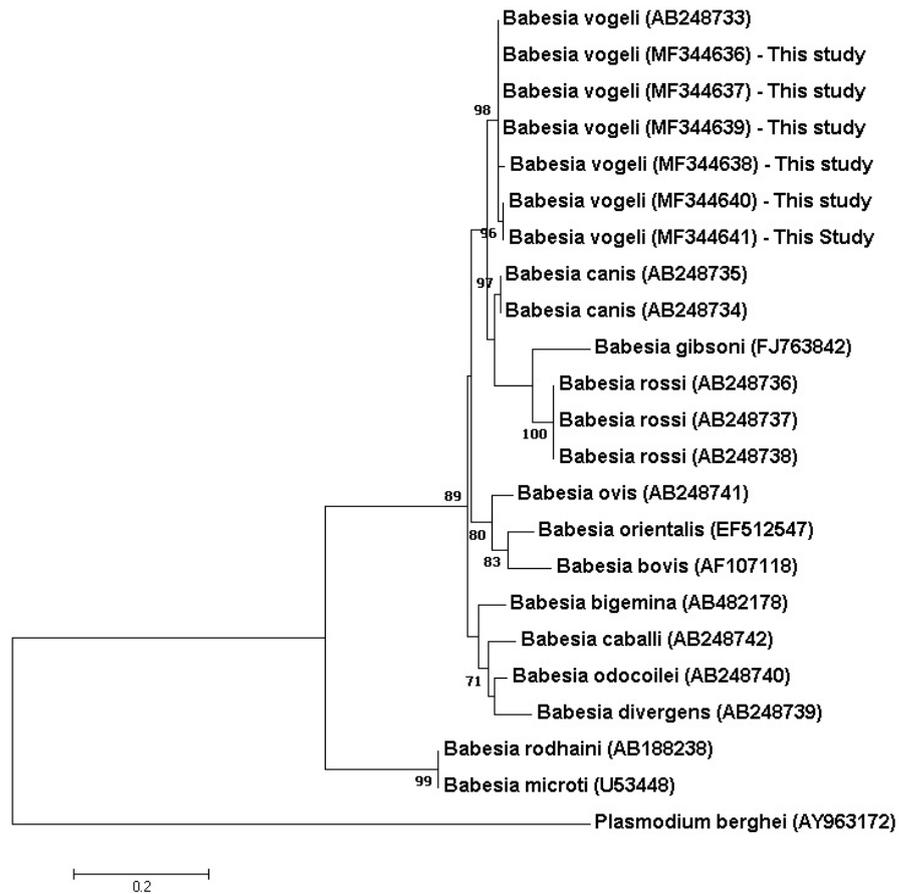
O *18S rDNA*-cPCR apresentou 8,66% (n = 26/300) de amostras positivas, assim como o *hsp70*-cPCR padronizado neste estudo. Os genes *18S rDNA* e *hsp70* foram capazes de detectar *B. vogeli* com a mesma sensibilidade (96,15%) e especificidade (99,63%). O teste de McNemar não mostrou diferença significativa (p> 0,05) (Tabela 3). Todas as amostras positivas do cPCR dos genes *18S rDNA* e *hsp70* foram sequenciadas. Os pontos positivos encontrados no *hsp70*-cPCR têm uma identidade de 99% com *B. vogeli*. As sequências encontradas pelo *18S rDNA*-cPCR também apresentaram 99% de identidade de *B. vogeli*. No entanto, uma das amostras encontradas com o *rDNA*-cPCR *18S* foi um falso positivo e mostrou no algoritmo BLAST 100% de cobertura com 96% de identidade para *R. vitalii*.

**Tabela 4.** Análise dos pares discordantes entre os resultados das sequências da região ribossômica *18S (18S rDNA)* e da proteína de choque térmico 70 kDa (*hsp70*) usando PCR convencional para a detecção molecular de *Babesia vogeli* em cães.

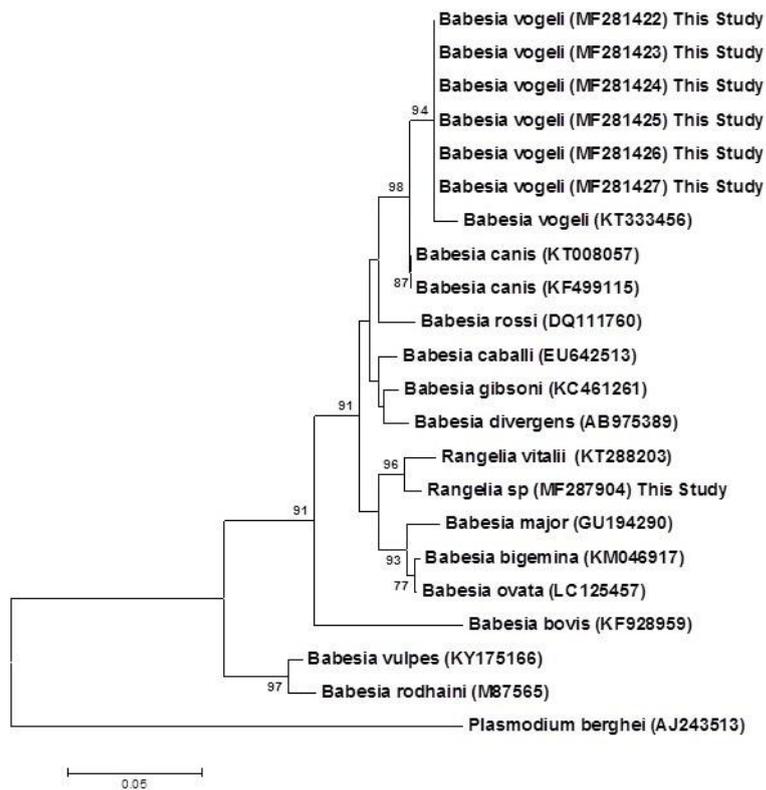
<i>18S rDNA</i>	<i>hsp70</i>		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	25	1*	26
<b>Negativo</b>	1*	273	274

\*p>0.05 indica que não existe diferença significativa entre os genes *18S rDNA* and *hsp70* pelo teste de McNemar quando o PCR convencional foi usado.

A análise filogenética revelou que as seis amostras sequenciadas para os genes de *hsp70* e *18S rDNA* agrupadas em um único clado com as sequências AB248733 (*hsp70*) e KT333456 (*18S rDNA*) de *B. vogeli* (Figuras 8 e 9). No entanto, quando a reconstrução filogenética foi realizada com o gene *hsp70*, o valor de bootstrap do clado de *B. vogeli* (98%) foi maior que o observado para a sequência de *18S rDNA* (94%). Em relação às *Babesia* spp. que infectam cães, o gene *hsp70* agrupou essas espécies de forma mais clara e precisa do que o *18S rDNA*, uma vez que a sequência de *B. gibsoni* agrupou-se em torno das espécies *Babesia* spp. que infectam cavalos (*B. caballi*) e bovinos (*B. divergens*). A sequência de *Rangelia* sp. encontrado neste estudo foi incluído na árvore filogenética *18S rDNA*, e agrupou-se em conjunto com a sequência *R. vitalii* com um alto valor de Bootstrap (96%) (Fig. 9).



**Figura 6.** Árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com sequências parciais do gene *hsp70* de *Babesia vogeli* e outros *Babesia spp.* Os números nos ramos indicam o valor de Bootstrap com 1000 pseudorepetições. Apenas as porcentagens de Bootstrap acima de 70% são mostradas.



**Figura 7.** Árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com sequências parciais do gene *18S rDNA* de *Babesia vogeli* e outros *Babesia* spp e *Rangelia* sp. Os números nos ramos indicam o valor de Bootstrap com 1000 pseudorepetições. Apenas as porcentagens de Bootstrap acima de 70% são mostradas.

## 5. DISCUSSÃO

A especificidade e a sensibilidade do qPCR dependem fortemente do design do primer. No presente estudo, os primers e sondas foram cuidadosamente projetados, apresentando alta complexidade, e a sonda não apresentou G no terminal 5'. A especificidade foi avaliada através de ensaio experimental com uma variedade de agentes patogênicos que infectam cães de muitas áreas geográficas, apresentando apenas ampliações para controles positivos de *B. vogeli*. No entanto, a especificidade analítica dos ensaios não foi testada *in vitro* com DNA de *B. canis*, *B. rossi*, *B. gibsoni*, *B. vulpes* e *B. conradae*. A análise de especificidade *in silico* realizada no software FastPCR (Kalendar et al., 2017) e o algoritmo primerBLAST (NCBI, Bethesda DM, EUA) demonstraram que os oligonucleotídeos projetados neste estudo não possui região complementar com o gene *hsp70* de *B. canis*, *B. rossi* e *B. gibsoni*. A análise *in silico* não foi possível com as espécies *B. vulpes* e *B. conradae*, uma vez que não há registro na base de dados Genbank para o gene *hsp70*.

A curva padrão provou que o qPCR projetado neste estudo foi eficiente, preciso e de alta sensibilidade. O ensaio foi capaz de detectar números de cópias de genes muito abaixo dos que se esperariam em infecção clínica. O limite de detecção apresentado pelo qPCR projetado neste estudo foi próximo ao mais sensível que é teoricamente possível conforme descrito pelas diretrizes do MIQE (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) (Bustin et al., 2009). A técnica qPCR também foi considerada robusta com alta precisão de acordo com as informações fornecidas anteriormente (Bustin et al., 2009). A eficiência mostrada foi dentro do intervalo recomendado pelas diretrizes MIQE para qPCR (Bustin et al., 2009).

Há evidências na literatura de que o gene *hsp70* tem apenas uma cópia nos genomas de *B. microti*, *B. bovis*, *Theileria annulata* e *Theileria parva* (Jie et al., 1996). É provável que o mesmo ocorra para *B. vogeli*. Este é um fator importante para a quantificação, uma vez que uma cópia significa um parasita e a quantificação resultante do parasita está mais próxima da realidade. Além da confirmação do diagnóstico, uma quantificação precisa pode fornecer um prognóstico confiável e pode ajudar a monitorar a terapia durante o tratamento.

Vários cPCRs foram projetados com base no gene *hsp70* de *B. vogeli*; no entanto, apenas alguns *hsp70*-qPCRs são descritos na literatura. Um qPCR multiplex

para a detecção simultânea de patógenos transmitidos por carrapatos *E. canis* e *B. vogeli* foi desenvolvido anteriormente (Peleg et al., 2010). Apesar da alta sensibilidade, a eficiência do ensaio *B. vogeli* foi muito baixa. O valor relatado por Peleg et al. (2010) é menor do que o padrão recomendado pelas diretrizes da MIQE (Bustin et al., 2009). A eficiência é um dos parâmetros mais importantes de um ensaio de qPCR e também é um indicador necessário para a quantificação (Svec et al., 2015). Uma alta eficiência é importante para o processo de quantificação, porque confirma que o ensaio tem linearidade na emissão de fluorescência. As reações com eficiências deprimidas irão cruzar a linha de base mais tarde do que o esperado, resultando em estimativas de quantificação errôneas (Kontanis e Reed, 2006). O qPCR desenvolvido pelo nosso estudo provou ser capaz de detectar e quantificar cópias de DNA de *B. vogeli* com maior eficiência e precisão. Uma comparação de marcadores moleculares revelou que *hsp70* é tão sensível quanto o *18S rDNA* porque a sensibilidade analítica era igual para ambos os alvos. Esses dados significam que *hsp70* pode ser usado em aplicações sistemáticas e na triagem de doenças de uma população desconhecida. Da mesma forma, a percentagem de especificidade obtida foi a mesma para ambos os alvos. No entanto, uma amostra apenas positiva para o *18S rDNA* obteve 96% de identidade de *R. vitalii*. *R. vitalii* é um piroplasma muito próximo da grande *Babesia* spp. que infectam cães, mas tem diferenças em seu ciclo biológico e patogenicidade. O status de uma espécie diferente depende da presença intracelular adicional dentro dos macrófagos e células endoteliais, que nunca foram relatados em *Babesia* spp. (Soares et al., 2011). Este protozoário foi confundido com formas intraeritrocíticas de *B. vogeli* antes e também foi considerado sinônimo de *B. vogeli* na literatura (Moreira, 1938; Levine, 1943; Paraense e Viana, 1948; Peirce, 2000). Embora não seja o foco do nosso estudo, este é o primeiro relato de um parasita intimamente relacionado com *R. vitalii* atuando como parasita de cães no sudeste do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Todas as sequências de *R. vitalii* de *18S rDNA* depositado na base de dados GenBank foram analisadas pelo algoritmo BLASTn e mostraram uma variabilidade de 2%. No entanto, a sequência obtida neste estudo mostra uma percentagem de identidade de 96% com outras sequências de genes do *18S rDNA* no GenBank, sugerindo que é um parasita intimamente relacionado com *R. vitalii*. A classificação dos piroplasmídeos dos gêneros *Babesia*, *Rangelia* e *Theileria* ainda está em processo de mudança.

## 6. CONCLUSÃO

O qPCR desenvolvido neste estudo mostrou-se eficiente e sensível para a detecção de *B. vogeli*, e é capaz de quantificar cópias de *B. vogeli* com precisão também. A comparação entre cPCR e qPCR favorece qPCR, garantindo uma alta sensibilidade. O qPCR projetado por este estudo pode ser eficaz para rastrear sangue doado em bancos de sangue veterinários, confirmação de diagnóstico e monitoramento terapêutico. Neste estudo, concluímos que o gene *hsp70* é um alvo eficiente para a detecção de *B. vogeli*. De acordo com a análise filogenética, o gene *hsp70* é um marcador molecular capaz de classificar *Babesia spp.* que infectam cães com maior precisão quando comparados com o marcador de *18S rDNA*. Além disso, mostrou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas comparações dos alvos *18S rDNA* e *hsp70*, embora a discriminação entre espécies possa ser complicada usando o *18S rDNA*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 135p.
- ANO, H., MAKIMURA S., HARASAWA R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *Journal Veterinary Medicine Sciencev*.63.p.111–113. 2001.
- APPLIED BIOSYSTEMS: Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Applied Biosystems tutorials p.15 2013. Disponível em:  
<[http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr\\_vs\\_tradpcr.pdf](http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf)>. Acesso em: 23 abr. 2017.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. *Sociedade Civil Mamirauá, Tefé*. p.380. 2007.
- BABÉS, V. Sur l'hémoglobine bacterienne du boeuf. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, v. 107, p. 692, 1888.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology* v.136, p.321-325, 2009.
- BANETH G, FLORIN-CHRISTENSEN M, CARDOSO L, SCHNITTGER L. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasite and Vectors*. v.8 p.20-27. 2015.
- BECK R, VOJTA L, MRLJAK V, MARINCULIC A, BECK A., Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Internal Journal Parasitology* v.39 p.843–8.2009.
- BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB: Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal Clinical Microbiology* v.41. p.4172-4177. 2003a.

BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, STEBBINS M, POORE M, BREITSCHWERDT E. Serosurvey of anti-*Babesia* antibodies in stray dogs and American pit bull terriers and American staffordshire terriers from North Carolina. *J Am Anim Hosp Assoc.* v.39. p.1–7.2003b.

BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. *Journal Veterinary Internal Medicine.*v.18. p.494–498. 2004.

BIRKENHEUER, A. J. Babesiosis. In: GREENE, C. E. (4 Ed.). *Infectious Diseases of the dog and cat, USA*, Elsevier p.771-784. 2012.

BORCHIELLINI, C.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J. PARCO Y. L. Phylogenetic Analysis of the Hsp70 Sequences Reveals the Monophyly of Metazoa and Specific Phylogenetic Relationships Between Animals and Fungi. *Molecular Biology Evolutionary.* v.6, p. 647-655. 1998.

BOOZER, L.; MACINTIRE, K. Canine babesiosis. *Veterinary of North Clinics America Small Animal Practice, Philadelphia*, v. 33, p. 885–904, 2003.

BRACCINI GL, CHAPLIN, EL, STOBBE, NS, ARAUJO, FAP, SANTOS, NR. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the veterinary faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986 - 1990. *Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS* v.20, p.134-149, 1992.

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

BUSTIN S., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITWER C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Journal Clinical Chemistry.* v.55. p.611-622. 2009.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment

Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes.

*Journal Eukaryotic Microbiology*, v.46, p.298-303, 1999

CASSINI, R., ZANUTTO, S., FRANGIPANE DI REGALBONO, A., GABRIELLI, S., CALDERINI, P., MORETTI, A., TAMPIERI, M.P., PIETROBELLI, M. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Veterinary Parasitology* v.165. p.30–35. 2009.

CAVALIER-SMITH, T., CHAO, E.E. & LEWIS, R. Multiple origins of Heliozoa from flagellate ancestors: New cryptist subphylum Corbihelia, superclass Corbistoma, and monophyly of Haptista, Cryptista, Hacrobia and Chromista. *Molecular Phylogenical Evolution*. v.93, p.331–362. 2015.

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

CHENG, Liang; ZHANG, David Y.; EBLE, John N. *Molecular Genetic Pathology*. 2. ed. New York: Springer-verlag, p. 1136. 2013.

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

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ, J., BULING, A., BARBA, J.C., MERINO, S., JEFFERIES, R., IRWIN, P.J., New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology* v.142, p.238–247. 2006

DANTAS-TORRES F. & FIGUEREDO L.A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology* v.141 p.197-203.2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*, v.1, p.1-17, 2008.

DA SILVA, C.B., SANTOS H.A., PIRES, M.S., VILELA, J.A.R., SANTOS, L.A., VITARI, G.V., PECKLE, M., COSTA, R.L., MASSARD, C.L.; A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. *Journal Veterinary Diagnosis Investigation* v.28, p.529-535. 2016.

DE ECHAIDE, ST, KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology* v.36, p.777-782, 1998.

DEPOIX D., CARCY B. JUMAS-BILAK E., PAGES M., PRECIGOUT E., SHERTTTERS T.P.M., RAVEL C., GORENFLOT A. Chromosome number, genome size and polymorphism of European and South African isolates of large *Babesia* parasites that infects dogs. *Parasitology* v.125. p. 313-312. 2002.

JEFFERIES, R., RYAN, U., JARDINE, J., BROUGHTON, D., ROBERTSON, I., IRWIN, P., Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, v.85. p.459–463. 2007.

FALKENÖ, U., TASKER, S., OSTERMAN-LIND, E., & TVEDTEN, H. W. *Theileria annae* in a young Swedish dog. *Acta veterinaria scandinavica*, v.55, p.1. 2013.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, Jr., P. How close is close: *16S rRNA* sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.42, n. 1, p. 166-170, 1992.

FREEMAN, M.D. Veterinary PCR Diagnostics. Bentham Science Publishers. 1ª Edição. Kindle edition. 2012.

FRITZ D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 11 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*. v.106 p.1339-1342. 2010.

FUKUMOTO S, XUAN X, SHIGENO S, KIMBITA E, IGARASHI I, NAGASAWA H, FUJISAKI K, MIKAMI T: Development of a polymerase chain reaction methods for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Journal Veterinary Medical Science* v.63. p.977-981.2001.

FUKUMOTO S, XUAN X, INOUE N, IGARASHI I, SUGIMOTO C, FUJISAKI K, NAGASAWA H, MIKAMI T, SUZUKI H: Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. *Molecular Biochemical Parasitology* v.131. p.129-136. 2003.

FURUTA, I.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; MACHADO, R.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*; Jaboticabal, v. 18, n.3, p. 41-45, 2009.

GEORGES K, EZEOKOLI CD, NEWAJ-FYZUL A, CAMPBELL M, MOOTOO N, MUTANI A, SPARAGANO OAE: The application of PCR and reverse line blot hybridization to detect arthropod-borne haemopathogens of dogs and cats in Trinidad. *Annual New York Academical Science* v.1149.p.196-199. 2008.

HOMER, M.J., AGUILAR-DELFIN, I., TELFORD 3RD, S.R., KRAUSE, P.J., PERSING, D.H., Babesiosis. *Clinical Microbiology*v.13, p.451–469, 2000.

IKADAI H, TANAKA H, SHIBAHARA N, MATSUU A, UECHI M, ITOH N, OSHIRO S, KUDO N, IGARASHI I, OYAMADA T: Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal Clinical Microbiology* v.42. p.2465-2469. 2004.

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

IRWIN, P.J., Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasite and Vectors* 2 v.1, 2009.

IZZI, S. A., MARTIN, D. S., CHAN, R. Y.Y., LEUTENEGGER, C.M. *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* infection dog. *Veterinary Clinical Pathology*v. 4214, p.471-475, 2013.

JIE, H.B., BAILEY, C.W., BIMAL, K.R., ESTES, D.M., KUMAR, N., CARSON, C.A., Single copy *Babesia microti* hsp70 *Molecular and Biochemical parasitology* v.83, p.241-246. 1996.

KALENDAR, R., KHASSENOV, B., RAMANKULOV, Y., SAMUILOVA O, IVANOV K.I., FastPCR: an in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. v.109, p.312-319. 2017.

KAUFMANN, S. H. E. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today* v.11 p.129–136. 1990.

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

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

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

KIM C., BLANCO L.B., ALHASSAN A., ISEKI H., YOKOYAMA N., XUAN X., IGARASHI I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology* v.151. p.158-163. 2008.

KOCH R. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplassen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* v.54, p.1–9. 1906.

KONTANIS, E.J., REED, F. Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors. *Journal of Forensic Science*. v.51. p.795-805. 2006.

KUBELOVÁ, M., SEDLÁK, K., PANEV, A., ŠIROKÝ, P. Conflicting results of serological, PCR and microscopic methods clarify the various risk levels of canine babesiosis in Slovakia: A complex approach to *Babesia canis* diagnostics. *Veterinary Parasitology*. v.191, p.353–357. 2013.

LEVINE, N.D. Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man, second ed. Burgess Publishing, Minneapolis, 406p. 1943.

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

LEVINE, N.D. Apicomplexa. In Parker, S.P., Synopsis and Classification of Living Organisms, vol. 1. McGraw-Hill, New York: p.571-587.1982.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* v.55 p.1151–1191. 1986.

LI, Y.; YANG, J.; CHEN, Z.; QIN, G.; LI, Y.; LI, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; GUAN, G.; YIN, H.; LUO, J.; ZHANG, L. *Anaplasma* infection of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) and ticks in Xinjiang, China. *Parasite and Vectors*. v.8, p.1-6, 2015.

LUCIDI, C. A.; ANGERAMI, J. T. S.; RODRIGUES, R. R.; TAKAHIRA, R. K. Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no estado de São Paulo: nota preliminar. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 231, 2004.

LYMBERG, A.J. & THOMPSON, R.C.A; Themolecular epidemiology of parasite infections: Tools and applications. *Molecular & Biochemical Parasitology* v.181, p.102-116. 2012.

MARTIN A.R., DUNSTAN R. H. ROBERTS T.K., BROWN G. K. *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology* v.112. p.63-65. 2006.

MATSUU A, KOSHIDA Y, KAWAHARA M. Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* in vivo and in vitro. *Veterinary Parasitology*. v.124, p.9-18. 2004.

MAYER, M. P., AND B. BUKAU. Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* v.62 p.670–684. 2005.

MAXAM AM, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.74.p.560-564.1977.

MEDRONHO, R. *Epidemiologia*. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 676p. 2009.

MONTEIRO, S.G. *Parasitologia na Medicina Veterinária*. 2ª ed. Gen, Rio de Janeiro, 351p. 2017.

MOREIRA, J. Sobre a natureza do nambiuvú dos cães. *Arquivos Institucional Biologia*. v.9, p.315–319. 1938.

MRLJAK, V., KULEŠ, J., MIHALJEVIĆ, Ž., TORTI, M., GOTIĆ, J., CRNOGAJ, M., ŽIVIČNJAK, T., MAYER, I., ŠMIT, I., BHIDE, M., BARIĆ RAFAJ, R. Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Disease* v.17, p.398–408. 2017.

MIRÓ, G., CHECA, R., PAPANINI, A., ORTEGA, N., GONZÁLEZ-FRAGA, J. L., GOFTON, A., IRWIN, P. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasites & Vectors*. v.8. p.21-27. 2015.

MÜLLER H, AYSUL N, LIU Z, SALIH DA, KARAGENC T, BEYER D, KULLMANN B, AHMED JS, SEITZER U. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of *Babesia canis* infections. *Transboundary Emergent Disease*. 57, 63-65.2010.

NUTTALL GHF. On Haematozoa occurring in wild animals in Africa. I. *Piroplasma rossi* n. sp. And *Haemogregarina canis adusti* n. sp. found in the jackal. 2. *Spirochaeta bovis caffris* n. sp. Found in the buffalo. *Parasitology* v.3 p.10. 1910.

O'DWYER, L. H. & MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1ª ed. Rio de Janeiro. L. F. Livros de Veterinária LTDA. p. 57-67, 2002.

OYAMADA M, DAVOUST B, BONI M, DEREURE J, BUCHETON B, HAMMAD A, ITAMOTO K, OKUDA M, INOKUMA H: Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of Eastern Sudan by using a

- screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical Diagnosis Laboratorial Immunology* v.12 p.1343-1346. 2005.
- OTRANTO D., DANTAS-TORRES, F., WEIGL, S., LATROFA, M.S., STANNECK,D., DE CAPRARIS, D., CAPELLI, G., BANETH, G., 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites and Vectors*. v.55, p.1-6. 2011.
- PATTON, W. S. 1910. Rapport préliminaire sur un nouveau piroplasma, *P. gibsoni* nov. sp. trouvé dans le sang du chien de madras et du chacal *Canis uureus*. *Bulletin de la Sociittk de Purhologie Exotique*. v.3. p.274-280.
- PARAENSE, W.L., VIANNA, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. *Memorial Instucional Oswaldo Cruz*. v.46, p. 595–603. 1948.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dog from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p.81-85, 2005.
- PEIRCE, M.A., 2000. Order Piroplasmorida. In: Lee, JJ et al. The Illustrated Guide to the Protozoa, second ed., Society of Protozoologists, Lawrence, 1, 347–353.
- PELEG, O., BANETH, G., EYAL, O., INBAR, J., HARRUS, S. Multiplex real time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*. v.173, p.292-299. 2010.
- PIANA GP, GALLI-VALERIO B. Su di un' infezione del cane con parassiti endoglobulari nel sangue. Nota preventiva. *Il Moderno Zooiatro* v.6, p.163.1895.
- PIRES, M.S. Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia sp.* e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro. 2013.126p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.
- POSADA, D., CRANDALL K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. v.14, p.817-818. 1998.
- PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; SIGRIST, B.; CHAE, J.-S.; LUTZ, H.; MADIGAN, J.E. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in

infected horses and snails by real-time PCR. *Veterinary Parasitology* v.90, p.129-135, 2000.

RAMOS, R.A.N., LATROFA, M.S., GIANNELLIA, A., LACASELLA, V., CAMPBELLA, B.E., DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*. 2014.

REICHENOW E. Uebertragungsweise und Entwicklung der Piroplasmen. *Zbl Bakt I Orig* v.135 p.108-19, 1935.

RUGGIERO, M.A., GORDON, D.P., ORRELL, T.M., BAILLY, N., BOURGOIN, T., BRUSCA, R.C., CAVALIER-SMITH, T., GUIRY, M.D. & KIRK, P.M. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS ONE* v.10, p.1-54. 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction, *Journal Veterinary Diagnosis Investigation*. v.23, p.770-774, 2011.

SCHOEMAN, J.P., 2009, 'Canine babesiosis', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* v.76, p.59–66.2009.

SILVA, G.V. O.; Avaliação experimental e estudos a campo relacionados a *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 em *Canis familiaris* no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

SKRABALO Z, DEANOVIC Z. Piroplasmosis in man; report of a case. *Medicine Geographic Tropical*. v.9. p.11–6. 1957.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. *USA Department Agriculture Bureau Animal Industry*, v.1, n.1, p.177-304, 1893.

- SOARES, J.F., GIROTTO, A., BRANDÃO, P.E., DA, A.S., LOPES, S.T.A., LABRUNA, M.B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 180, 203–208. 2011.
- SOLANO-GALLEGO L, TROTTA M, CARLI E, CARCY B, CALDIN M, FURLANELLO T: *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology* v.157 p.211-221. 2008.
- SOLANO-GALLEGO, L. & BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra *Veterinary Parasitology* v.181. p.48-60. 2011.
- SOLANO-GALLEGO L., SAINZ A., ROURA X., ESTRADA-PEÑA A., MIRÓ G. A review of canine babesiosis: the European perspective *Parasite and Vectors* v. 9. p. 336. 2016.
- SPOLIDORIO M.G., LABRUNA M.B., MACHADO R.Z., MORAES-FILHO J., ZAGO A.M., DONATELE D.M., PINHEIRO S.R., SILVEIRA I., CALIARI K.M. & YOSHINARI N.H. 2010. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine Hygiene* v.83. p.201-206. 2010.
- SUZUKI, K., WAKABAYASHI, H., TAKAHASHI, M., FUKUSHIMA, K., YABUKI, A., ENDO, Y. A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. *Journal Veterinary Medicine Science*. v.69. p.563–568. 2007.
- SVEC D., TICHOPAD, A., NOVOSADOVA, V., PFAFFL, M.W., KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. v.3. p.9-16. 2015
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. V.30. p.2725–2729. 2013.
- TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p. 177-180, 2006.

- UILENBERG G, FRANSSEN FFJ, PERIÉ NM, Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q* v.11 p.33-40. 1989.
- UILENBERG, G. Babesia – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1-2. p. 3-10, 2006.
- UNGAR DE SÁ M.F.M., UNGAR DE SÁ J.E., BITTENCOURT D.V.V., BISPO A.C., RÉGIS A.M.M., SOUZA FILHO N.J., GOMES NETO C.M.B., SOUZA B.M.P.S., BITTENCOURT T.C.C. & FRANKE C.R. 2007. Estudo retrospectivo (1991-2005) dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde Produção Animal*. v.8. p.178-183. 2007.
- VAN DER PLOEG L.H., GIANNINI S.H., CANTOR C.R. *Heat shock* genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*. v.228 p.1443–1446. 1985.
- VERLENGIA, R.; Análises de RNA, proteínas e Metabólitos Metodologia e Procedimentos; 1 ed., ed. Santos, São Paulo, 454p. 2013.
- VIDOTTO, O. & TRAPP, S. M. Babesiose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 58-62, 2004.
- VILELA, J.A.R., PIRES, M.P., BEZERRA, C.S., PEIXOTO, M.P., FALQUETO, A., SANTOS, A.Z., SANAVRIA, A., MASSARD, C.L., FACCINI, J.L.H., Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* v.35. p.63-68. 2013.
- WOOSE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.
- YAMASAKI, M. TAJIMA, K. W. LEE, J. R. JEONG, O. YAMATO, AND Y. MAEDE Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Veterinary Parasitology* v.110p.123–129.2002.
- YAMASAKI, M. INOKUMA, H., SUGIMOTO, C. SHAW, S.E., AKTAS, M. YABSLEY, M.J., YAMATO, O., MAEDE Y. Comparison and phylogenetic analysis of

*heat shock protein 70* gene of *Babesia* parasites from dogs. *Veterinary Parasitology* v.145 p.217–227. 2007.

YEAGLEY, T.J., REICHARD, M.V., HEMPSTEAD, J.E., ALLEN, K.E., PARSONS, L.M., WHITE, M.A., LITTLE, S.E., MEINKOTH, J.H. Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* ‘Spanish isolate’ in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J. Am.Vet. Med. Assoc.* v.235, p.535–539. 2009.

ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H. & GOTHE, R., ‘Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs’, *Parasitology Research* v.84, p.544–548.1998.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). *Biologia molecular básica*. 5. ed., ed. ArtMed. Porto Alegre. 2014.

ZANETTE, M. F., LIMA, V. M. F., LAURENTI, M.D., ROSSI, C. N., VIDES, J. P., VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. W., MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.47. p.105-107. 2014.

ZHOU J, FUKUMOTO S, JIA H, YOKOYAMA N, ZHANG G, FUJISAKI K, LIN J, XUAN X: Characterization of the *Babesia gibsoni* P18 as a homologue of thrombospondin related adhesive protein. *Molecular Biochemical Parasitology* v.148 p.190-198. 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**Aspectos epidemiológicos associados a presença do DNA de  
*Babesia vogeli* em cães na Microrregião de Itaguaí, Rio de  
Janeiro, Brasil**

## RESUMO

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Detecção molecular e epidemiologia de *Babesia vogeli* em cães domiciliados da Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. 103p.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

As doenças hemoparasitárias são frequentes em animais domésticos, particularmente no Brasil, um país tropical que contém uma ampla gama de vetores. Este estudo investigou a epidemiologia das infecções de *Babesia vogeli* em cães infectados naturalmente da Microrregião de Itaguaí, sudeste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. O patógeno foi rastreado por qPCR a partir de 390 amostras de sangue total de cães domesticados usando o gene codificante da proteína de choque térmico 70 kDa (*hsp70*). As características relacionadas ao hospedeiro e ao meio ambiente foram coletadas usando um questionário. A análise bivariada foi utilizada para avaliar cada fator individualmente. O teste de correlação phi foi utilizado para verificar colinearidade. As variáveis com  $p < 0,1$  e uma correlação baixa ou moderada com as demais variáveis foram selecionadas para a análise multivariada. Foram criados vários modelos e o melhor modelo de regressão logística foi escolhido usando o Critério de Informação Akaike (AIC). O modelo final foi utilizado para determinar quais variáveis estavam intimamente relacionadas às infecções por *B. vogeli* em cães. Das 390 amostras de sangue de cachorro, 15,66% foram positivas. As variáveis contato do gato, idade, acesso ao abrigo, acesso de rua ou madeira, infestação de carrapatos e tamanho da pelo foram incluídos no modelo final. Por análise de regressão logística, três variáveis explicaram a infecção canina por *B. vogeli*. As variáveis, idade (odds ratio = 2,12; p-valor  $< 0,05$ ; intervalo de confiança [CI]: 1,13–3,96) e infestação de carrapatos (OR = 2,08; p-valor  $< 0,05$ ; IC: 1,10–3,93) e abrigo (OR = 2,22; p-valor  $< 0,05$ ; CI: 1,16–4,26), foram determinados como associados a infecções por *B. vogeli* em cães domiciliados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Estes dados indicam que a idade do animal, a presença de carrapatos e a falta de abrigo afetam diretamente a epidemiologia da babesiose canina na região.

**Palavras chave:** Babesiose, estatística, epidemiologia

## ABSTRACT

PAULINO, Patrícia Gonzaga. **Molecular detection and epidemiology of *Babesia vogeli* in domiciliated dogs from Itaguaí microrregion, Rio de Janeiro State, Brazil. 103p.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Hemoparasitic diseases are prominent in domestic animals, particularly in Brazil, a tropical country with a wide range of vectors necessitating veterinary care. This study investigated the epidemiology of *Babesia vogeli* infections in naturally infected dogs from southeast Rio de Janeiro State, Brazil. The pathogen was screened by qPCR from 390 whole blood samples from domesticated dogs using the *heat shock protein 70 kDa (hsp70)* gene. Characteristics related to the host and its environment were collected using a questionnaire. Bivariate analysis was used to evaluate each factor individually. A phi correlation test was used to verify collinearity. The variables with  $p < 0.1$  and a low or moderate correlation with the other variables were selected for the multivariate analysis. Multiple models were created, and the best logistic regression model was chosen using the Akaike Information Criterion (AIC). The final model was used to determine which variables were closely related to *B. vogeli* infections in dogs. Of the 390 dog blood samples, 15.66% were positive. The variables cat contact, age, shelter access, street or woods access, tick infestation and fur size were included in the final model. Per the logistic regression analysis, three variables explained the canine *B. vogeli* infection. The variables, age (odds ratio [OR] = 2.12;  $p$ -value  $< 0.05$ ; confidence interval [CI]: 1.13–3.96), tick infestation (OR=2.08;  $p$ -value  $< 0.05$ ; CI: 1.10–3.93) and shelter (OR = 2,22;  $p$ -value  $< 0,05$ ; CI: 1.16–4.26), were determined to be associated with *B. vogeli* infections in domiciled dogs in the state of Rio de Janeiro, Brazil. These data indicate that the age of the animal, the presence of ticks and the lack of shelter directly affect the epidemiology of canine babesiosis.

**Keywords:** babesiosis, statistic, epidemiology

## 1. INTRODUÇÃO

*Babesia vogeli* é o agente etiológico da babesiose canina. No Brasil, é transmitido por carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (O'Dwyer & Massard, 2002). Os sinais clínicos são inespecíficos, porém anorexia, pirexia, petéquias, epistaxe e esplenomegalia são frequentemente relatados (Solano-Gallego et al, 2016). Em relação às alterações laboratoriais são descritos anemia, hemoglobinúria e trombocitopenia (Martin et al, 2006). O diagnóstico é realizado com base nos sinais clínicos, exames laboratoriais e análise de esfregaço sanguíneo (Vilela et al, 2013). Solano-Gallego (2016) relatam que casos crônicos ou menos virulentos podem não ser detectados pelo exame do esfregaço devido à sua baixa parasitemia. Este dado está de acordo com Miranda et al (2008) que observaram baixa frequência de positividade com base no exame de esfregaço de cães de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro, uma cidade considerada endêmica da babesiose. Em amostras consideradas negativas, muitas vezes podem ser confundidas com outros hemoparasitos ou outras doenças com sintomas hematológicos similares. Schoeman (2009) relata que, em alguns testes citológicos, a anemia hemolítica imune mediada por imunidade pode ser confundida com a babesiose canina. Outra questão importante em relação ao exame citológico é a incapacidade de diferenciar grandes espécies de *Babesia spp.*

Devido aos sinais clínicos inespecíficos, bem como a alta frequência de falsos negativos em esfregaços de sangue examinados por microscopia de luz, outras técnicas de laboratório, como métodos moleculares e testes de imunodiagnóstico, são necessárias para confirmar a infecção e continuar com o tratamento (Solano-Gallego et al., 2016).

Confirmar o diagnóstico de babesiose não é comum na prática veterinária de rotina. A infecção causada por *B. vogeli* é muitas vezes confundida com outros hemoparasitas. Maciera et al. (2005) relataram que muitos clínicos no Brasil, incluindo Rio de Janeiro, usam a presença de apenas trombocitopenia para fazer um diagnóstico presuntivo de infecção por *Ehrlichia canis* em cães. O uso de doxiciclina isolada e frequentemente é adotado para eliminar parasitas circulantes no sangue, especialmente *E. canis*. Embora os antibióticos não sejam a terapia de escolha para os piroplasmídeos, Vercammen et al. (1996) relataram que a doxiciclina pode reduzir a gravidade dos sinais clínicos na babesiose canina. No entanto, este tratamento não elimina *Babesia spp.* e a doença pode ressurgir. Brandão et al. (2003) relataram que o uso de dipropionato de

imidocarb em duas doses de 7 mg / kg, com um intervalo de 14 dias, pareceu efetivo na eliminação de *Babesia* spp. grandes. Portanto, a ocorrência de babesiose é muitas vezes subdiagnosticada e são necessários estudos epidemiológicos para determinar a frequência de animais parasitados em uma área específica, bem como as variáveis ambientais e outros fatores relacionados ao hospedeiro, levando a infecções por *B. vogeli* em cães (Maia et al., 2007).

No Brasil, pesquisas epidemiológicas sobre a frequência, bem como outros fatores relacionados à babesiose canina, foram realizadas em áreas endêmicas e não endêmicas. Muitos destes estudos determinaram a presença deste agente infeccioso canino por ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI) (Mrljak et al., 2017). No entanto, estudos epidemiológicos transversais baseados em técnicas sorológicas podem levar ao viés temporal, uma vez que a presença de anticorpos circulantes não indica necessariamente uma infecção atual. Além disso, há uma tendência para os testes sorológicos sobrestimar a frequência de protozoários, uma vez que títulos elevados de anticorpos circulantes podem permanecer por longos períodos (Solano-Gallego et al., 2016). Uma variedade de ferramentas moleculares, incluindo o ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), a reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR) e a análise de derretimento de alta resolução (HRM) são usadas para examinar diretamente os hemoparasitos de amostras clínicas ou ambientais, proporcionando relativamente baixo custo, testes moleculares rápidos de alto rendimento (Lymbery e Thompson, 2012). O qPCR permite a visualização do ciclo do processo de reação por ciclo, reduzindo o tempo para obter resultados e evitando a contaminação pós-amplificação. Portanto, esse método foi escolhido como teste de detecção para *B. vogeli* na região estudada.

Muitos estudos epidemiológicos realizam apenas análises bivariadas para determinar os fatores relacionados à infecção (Nalubamba et al., 2011; Bashir et al., 2009). Assim, apenas são avaliadas variáveis epidemiológicas isoladas, tornando a análise estatística incompleta, pois outros fatores não são levados em consideração. A análise de regressão logística múltipla é utilizada para saber quais outros fatores influenciam a epidemiologia da babesiose canina em uma região (Medronho, 2009). Aqui, variáveis múltiplas são analisadas em conjunto, proporcionando um resultado mais compreensivo.

Este estudo utilizou qPCR com base no gene *hsp70* para determinar a frequência de *B. vogeli* e desenvolver um modelo epidemiológico utilizando análise de regressão logística múltipla para determinar os fatores associados às infecções por *B. vogeli* em cães infectados naturalmente no sudeste do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos epidemiológicos

No Brasil, pesquisas epidemiológicas sobre a frequência e os fatores de risco associados a babesiose canina vem sendo conduzida em diferentes estados da federação, tanto em áreas consideradas endêmicas para a doença, quanto em áreas não endêmicas. Em muitos destes estudos, ensaios sorológicos através reação da imunofluorescência indireta (RIFI) foram preconizados visando determinar de forma indireta a circulação deste agente infeccioso em cães e carrapatos (Ribeiro et al., 1990; Dell'Porto & Oliveira, 1993; Ribeiro et al., 2014).

A prevalência dos casos de babesiose predominantemente causados por *B. vogeli* no Brasil varia de 18.8% a 73.3% (Spolidorio et al., 2010). A frequência pode variar bastante de uma região para outra, assim como de um estado para o outro ou mesmo de um período para outro em uma mesma área. Geralmente, em áreas consideradas endêmicas para babesiose canina é possível observar elevadas frequência de soropositividade destes animais frente Imunofluorescência indireta. Mossard et al (2006) relatou uma soropositividade de 46,0% no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Em estudos efetuados em outros municípios como: Londrina, PR (36%), São Paulo, SP (42,4%), Belo Horizonte, MG (66,9%) e Jaboticabal, SP (67%) (Ribeiro et al., 1990; Dell'Porto et al., 1993; Trapp et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

Em algumas regiões do Brasil foram realizados estudos epidemiológicos baseados em ferramentas moleculares. No Estado do Maranhão a frequência do parasita foi 3,3%, no Estado de São Paulo 8% e no Estado do Paraná 38,2% (Silva et al. 2012; O'Dwyer et al. 2009; Jojima et al. 2008).

Dentre as características associadas a doença, vários fatores já foram associados a babesiose na literatura. Algumas características intrínsecas do cão como idade, sexo, raça, porte e pelo já foram discutidas em muitos estudos epidemiológicos. Solano-Gallego et al (2008) comentam sobre a propensão de animais jovens à adquirirem babesiose severa. O gênero do animal não foi associado ao risco de positividade em muitos estudos epidemiológicos (Maia et al, 2007; Costa-Júnior et al, 2009; Araújo et al 2015). Porém, Dell'Porto (1986) observou uma maior frequência em fêmeas e

argumenta que essa diferença pode estar associada aos hábitos sedentários da fêmea após parto. Bashir et al. (2009) realizaram um estudo de *Babesia spp.* em cães, observaram uma prevalência aumentada em machos e argumentaram que isso pode estar vinculado a *B. gibsoni*, devido a lesões ou mordidas em lutas, o que promove a transmissão direta.

Alguns artigos relatam associação de *Babesia spp.* com raças caninas específicas, como Greyhounds, German Shepherd e Komondor (Taboada et al., 2000; Homer et al, 2000). Quanto ao porte, Araújo et al (2015) relataram porte médio como fator de risco relacionado a doença.

Em relação a características extrínsecas, Araújo et al. (2015) sugeriram que animais com acesso a matas e áreas urbanas tem maior risco de adquirir a moléstia. Maia et al (2007) observaram maiores taxas de infecção em áreas mais pobres onde os cães se movem mais livremente dentro do ambiente e em que os proprietários provavelmente não podem pagar tratamentos veterinários ou cuidados domiciliares adequados para seus animais de estimação.

*Babesia vogeli* é considerada endêmica nas áreas urbanas onde existe uma alta prevalência de infestação de carrapatos em cães (Passos et al, 2005). Entretanto, Labruna & Pereira (2001) afirmam que tanto animais urbanos como animais rurais são propensos a se infestarem com *Rhipicephalus sanguineus*, vetor da doença. Outros fatores como o hábito de viver solto ou preso na propriedade, hábito de somente conviver com o proprietário dentro das residências podem estar associados à infecção por patógenos transmitidos pelo carrapato, visto que essas características estão associadas com a biologia do vetor.

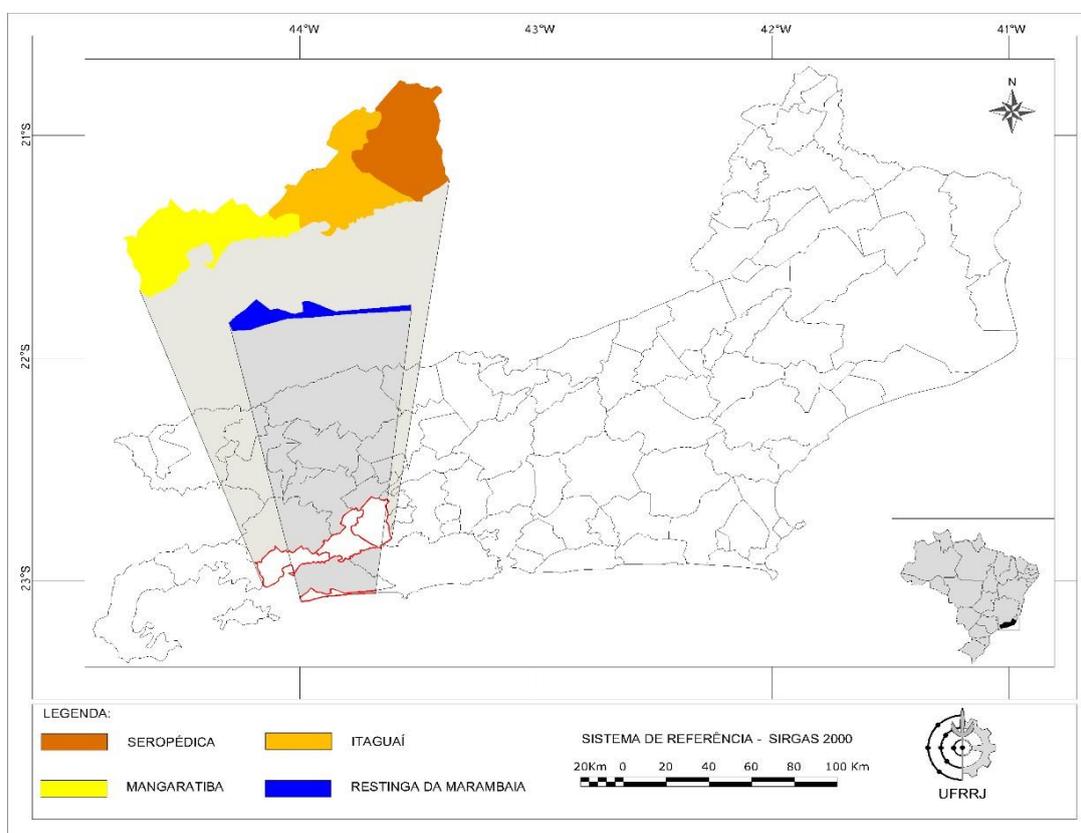
Com base na importância de se obter dados a respeito da presença do parasita foi realizado um estudo epidemiológico através das informações coletadas durante o estudo e a detecção molecular da *B. vogeli* nas amostras sanguíneas de cães domiciliados da Microrregião de Itaguaí.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Descrição do local do estudo

O alvo dessa pesquisa é a Microrregião de Itaguaí (Figura 1) que pertence a Mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro e é composta por três cidades, Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba.

Coordenadas geográficas: Município de Itaguaí (22° 51'08'' latitude Sul; 43° 46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros); Município de Seropédica (22° 44' 38'' latitude Sul; 43° 42' 27'' longitude Oeste;Altitude 26metros); Município de Mangaratiba (22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitudeOeste; altitude 18 metros).



**Figura 1:** Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba.

Esse local caracteriza-se por possuir uma área de 907,007 km<sup>2</sup>, uma população estimada em 216.985 habitantes (CENSO, 2010) e apresentar clima tropical com temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C (Pires et al, 2013).

Uma variedade de municípios (Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Queimados, Japeri,

Paracambi, Piraí, Rio Claro e Angra dos Reis) fazem fronteiras com a região estudada, por esse motivo, a veiculação de pessoas e animais no local é assídua. Além disso, o grande número de rodovias que atravessam essa zona favorecem o deslocamento.

### 3.2 Tamanho da amostragem e coleta

A falta de dados de frequência sobre *B. vogeli* em amostras de cães de sangue total através de técnicas moleculares levou a aplicar uma prevalência esperada de 50%, que representa o número máximo de tamanho da amostra, um erro de 5% e uma precisão de 5% (Medronho et al., 2009). O número da amostra foi definido de acordo com a equação descrita por Sampaio (2002):

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

Na qual N representa o tamanho da amostragem;  $P_{\text{esp}}$  significa prevalência esperada e  $d^2$  é igual à precisão absoluta desejada.

Por esta equação, foram necessárias 384 amostras de sangue para cães na região estudada.

A coleta das amostras foi realizada no período de Março de 2011 à Dezembro de 2013 por conveniência não probalística, onde as residências foram visitadas e, após consentimento do proprietário ou responsável, os animais foram submetidos aos exames clínicos e as amostras de sangue foram coletadas. O número total de amostras coletadas na microrregião de Itaguaí foi de 390, distribuídas da seguinte forma: Itaguaí (n=145) e Seropédica (n=150) e Mangaratiba (n=95). As amostras de sangue de cães foram coletadas por venopunção cefálica em tubos de vácuo estéril contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em um volume de 2 a 5 mL .

Múltiplos cães das mesmas propriedades foram incluídos no estudo. Estes animais tinham acesso a cuidados veterinários, mas não com frequência ou regularmente.

Os carrapatos que estavam no meio ambiente foram coletados em etanol a 70% médio e identificados no Laboratório de Hemoparasitas W. O. Neitz, Rio de Janeiro.

### 3.3 Controle padrão

O sangue do controle padrão positivo foi obtido de um cão apresentando sinais clínicos de babesiose, inclusões intraeritrocíticas observadas no exame citológico, positivas para a subunidade 18 do DNA ribossômico (18S rDNA) de *B. vogeli* em PCR convencional descrito por Carret et al. (1998) e positivo para o gene *hsp70* de *B. vogeli* em PCR convencional descrito por Paulino et al (2018 *in press*).

O fragmento foi purificado com CleanSweep (Applied Biosystems®) e sequenciado. A sequência do 18S rDNA obteve 100% de identidade com *B. vogeli* e foi depositada na GenBank sob o número de acesso MF459002.

O controle padrão negativo foi obtido de um cão nunca exposto a carrapatos. A amostra foi previamente testada pelo teste SNAP 4Dx (laboratórios Idexx, Maine, EUA). Após o resultado negativo, o sangue foi extraído e testado para a subunidade 18 do DNA ribossômico (18S rDNA) de *B. vogeli* em PCR convencional descrito por Carret et al. (1998) e para o gene *hsp70* de *B. vogeli* em PCR convencional descrito por Paulino et al (2018 *in press*). O resultado foi negativo em todos os ensaios.

A água livre de nuclease (Ambion®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) também foi usada como controle padrão negativo.

Para evitar problemas de contaminação, processos de extração de DNA, preparação da mistura de reagentes, adição de reações de DNA e eletroforese em gel de agarose seguido de visualização dos resultados foram realizados em diferentes ambientes respeitando um fluxo unidirecional. Além disso, a preparação da mistura de PCR foi realizada em uma câmara de fluxo laminar vertical (Trox® Technik, Butantã, SP, Brasil) usando um conjunto diferente de pipetas de precisão e filtro esterilizado e ponteiros descartáveis (Applied Biosystems®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

### 3.4 Extração de DNA

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob refrigeração. Em seguida, as amostras foram aliqüotadas em tubos de polipropileno de 1,5ml e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises.

A extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) foi realizada com kit comercial (DNeasy Blood –tissues- Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Após extração as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e padronizadas a 50 ng/μL. As amostras foram mantidas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares.

### **3.4 Detecção molecular**

Todas as amostras foram testadas por qPCR com base no gene *hsp70* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores, BvqF (5'-GCTGGTGACACCCACCTT-3') e BvqR (5'-CAACAAGCGTGCCCTCC-3') e a sonda de hidrólise Bvq (5'-NED-CCTCCTCGTTGAGCACT-MGB-3') como descrito por Paulino et al. (2018, *in press*). As reações foram realizadas em um volume final de 12 μL no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA), contendo: 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x), 800 nM de cada iniciador, 250 nM de Sonda e 300 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 50 ° C durante 2 minutos, 95 ° C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 ° C durante 15 segundos e 60 ° C durante 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicata. As amostras com amplificação inferior a 40 valores de ciclos de quantificação (Cq) foram consideradas positivas.

### **3.5 Análise da presença de inibidores**

Todas as amostras de DNA do sangue total canino foram testadas por PCR convencional visando o gene codificante da proteína Beta Actina (*ACTB*) seguindo as condições descritas por Brinkhof et al. (2006). Esta reação avaliou a eficiência do processo de extração de DNA e identificou a presença de inibidores. Além disso, um teste de inibição também foi realizado adicionando um controle padrão positivo com 100 cópias de um fragmento do gene *hsp70* em cada amostra extraída de DNA para verificar a presença de inibidores de PCR.

### **3.6 Questionário epidemiológico**

Um questionário semi-estruturado foi aplicado ao responsável, obtendo-se informações relativas a cada animal, destacando aspectos como sexo (feminino ou

masculino); Idade ( $<2$  anos ou  $\geq 2$  anos); Definição racial (cães de raça definida ou cães de raça mista); Tamanho do cão (grande (50 cm ou mais) ou pequeno / médio (menor que 50 cm); História de infestação de carrapatos (sim ou não); Acesso local do cão (ambiente urbano / Quintal / pastagem / floresta); Contato com outras espécies animais (sim ou não); Tratamento com parasiticida (sim ou não); Habitat do cão como Urbano ou rural (com base no perímetro urbano delimitado por Governos municipais); Condição de higiene ambiental como insatisfatória ou satisfatória (com base na limpeza do ambiente e a presença de fezes no local onde se encontra o cão); Assistência veterinária (sim ou não); Infestação de carrapato (presença ou ausência de carrapatos no momento da colheita da amostra de sangue); e a presença de ectoparasitas (presença de ou ausência de carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros no momento de coleta). A positividade dos cães para *B. vogeli*, determinada a partir do *genehsp70*, foi associada através do teste Qui-quadrado em nível de 5% de significância com as variáveis obtidas por meio da aplicação do questionário epidemiológico.

### 3.7 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos valores de frequência de positividade dos cães com babesiose, considerando um intervalo de confiança de 95% de significância.

Para avaliar os possíveis fatores associados aos resultados de testes positivos nos cães, as variáveis do questionário epidemiológico foram analisadas de forma independente como função da frequência de detecção de *B. vogeli* usando o teste do qui-quadrado a um nível de significância de 5% no programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007). Foram selecionadas variáveis com diferença significativa ( $p < 0,1$ ) do teste do qui-quadrado.

Em seguida, foi confeccionada uma tabela de contingência 2x2 para o do teste de correlação de Phi( $\phi$ ), com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo de regressão logística. Os valores de  $\phi$  variam entre -1 e +1 (Lira et al., 2004). As matrizes de correlação foram feitas no programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007).

Para avaliar os fatores de risco associados a *B. vogeli* em cães, um método de regressão logística foi realizado utilizando o software R versão 2.11.1 (R Development

Core Team, 2010) utilizando a interface gráfica R-Studio (The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). O modelo multivariado utilizou a variável dependente (resultado da qPCR hsp70 para *B. vogeli*) em nível dicotômico qualitativo (negativo=0; positivo=1) em função das variáveis independentes presentes no questionário epidemiológico, em nível de 5% de significância.

### **3.8 Consentimento do comitê de ética**

Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Rural Federal do Rio de Janeiro, número 3915240616.

#### 4. RESULTADOS

Para o gene *hsp70*, 14,10% dos animais (n = 55/390) foram positivos por PCR para o fragmento de 118pb de *B. vogeli* na região. Destes animais, 16,67% (n = 25/150) pertenciam ao município de Seropédica, enquanto 14% (n = 21/150) pertenciam a Itaguaí e 10% (n = 9/90) a Mangaratiba (Tabela 1).

Dentre os fatores extrínsecos, presença de carrapatos (p <0.0002), ausência de abrigo (p <0.0002), acesso a ruas ou bosques do bairro (p <0.004), má higiene ambiental (p < 0,007), falta de cuidados veterinários (p <0,004) e contato direto com gatos (p <0,01) foram todos associados à presença de DNA de *B. vogeli* por análise bivariada(Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise descritiva e bivariada das características extrínsecas relacionadas aos cães infectados por *Babesia vogeli*, diagnosticados através do gene *Hsp70* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Características Extrínsecas	Análise descritiva				Análise Bivariada		
	N	N +	N -	%	IC 95%	x <sup>2</sup>	P
<b>Dos cães</b>							
<b>Área de residencia</b>							
Rural/Periurbana	184	30	154	16%	0.76–2.61	1.39	0.23
Urbana	206	25	181	12%			
<b>Cidades</b>							
Mangaratiba	92	9	83	10%			
Seropédica	150	25	125	17%	0.31–1.56	2.23	0.32
Itaguaí	148	21	127	14%			
<b>Vive somente dentro de casa</b>							
Sim	50	6	44	12%	0.48–3.73	0.21	0.64
Não	340	49	291	14%			
<b>Contato com gatos</b>							
Sim	79	18	61	23%	1.09–4.23	6.16	0.01
Não	311	37	274	12%			

<b>Acesso</b>								
Rua	191	17	174	9%	1.26–4.74	8.36	0.0040	
Floresta	199	38	161	19%				
<b>Infestação de Carrapatos</b>								
Sim	179	38	141	21%	1.61–6.04	13.87	0.0002	
Não	211	17	194	8%				
<b>Abrigo</b>								
Sim	256	24	232	9%	1.56–5.44	13.74	0.0002	
Não	134	31	103	23%				
<b>Condições higiênicas do ambiente</b>								
Insatisfatória	187	38	149	20%	1.46–5.48	11.46	0.007	
Satisfatória	203	17	186	8%				
<b>Assistência Veterinária</b>								
Sim	177	15	162	8%	1.28–5.04	8.47	0.004	
Não	213	40	173	19%				
<b>Tratamento anti-helmíntico</b>								
Sim	261	35	226	13%	0.44–1.62	0.31	0.57	
Não	129	20	109	16%				
<b>TOTAL</b>	<b>390</b>	<b>55</b>	<b>335</b>	<b>15%</b>				

Legenda: N: número de animais examinados pela PCR em tempo real; N+: Número de animais positivos para Babesiose; N-: Número de animais negativos para Babesiose;  $\chi^2$ : Teste Qui-quadrado; P: p-valor; IC: Intervalo de Confiança.

Dentre as características intrínsecas, a idade dos cães e o comprimento da pelo foram ambos correlacionados com infecções por *B. vogeli* na análise bivariada ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Os animais com pelos curtos tinham um valor de p menor que 0,1 no teste do qui-quadrado ( $p = 0,07$ ). As outras variáveis intrínsecas relacionadas ao hospedeiro não apresentaram associação ( $p > 0,1$ ) com *B. vogeli* com base em qPCR e análise bivariada, portanto não foram incluídas no modelo final de regressão logística.

**Tabela 2.** Análise descritiva e bivariada das características intrínseca aos cães infectados por *B. vogeli*, diagnosticados através do gene *hsp70* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.

Características Intrínsecas dos cães	Análise Descritiva				Análise Bivariada		
	N	N +	N-	(%)	IC 95%	$\chi^2$	P
<b>Sexo</b>							
Feminino	186	25	161	13%	0.48–1.65	0.13	0.72
Masculino	204	30	174	15%			
<b>Raça</b>							
Sem raça definida	264	41	223	16%	0.74–3.04	1.37	0.25
Com raça	126	14	112	11%			
<b>Idade</b>							
<5 years	127	27	100	21%	1.21–4.20	7.39	0.005
>5years	263	28	235	11%			
<b>Pelo</b>							
Pequeno	191	34	157	18%	0.29–1.01	4.22	0.056
Médio/longo	199	21	178	11%			
<b>TOTAL</b>	<b>390</b>	<b>55</b>	<b>335</b>	<b>14%</b>			

Legenda: N: número de animais examinados pelo qPCR; N+: Número de animais positivos par Babesiose; N-: Número de animais negativos para Babesiose;  $\chi^2$ : Teste Qui-quadrado; P: p-valor; IC: Intervalo de Confiança. SRD: Sem raça definida.

O teste phi foi realizado, mas os fatores não apresentaram colinearidade forte. O intervalo de valores  $\phi$  foi de 0,01 a 0,51 (Tabela 3), e foi considerado colinearidade fraca entre as variáveis. Portanto, todas as variáveis podem entrar na análise multivariada.as amostras testadas

**Tabela 3:** Matriz de correlação com os valores do teste phi.

	ZONA	SEXO	IDADE	RAÇA	PELO	ACESSO	RESID	GATOS	CAR	ABRIGO	HIG	VET	PARASI
ZONA	–	0.12	0.15	0.2	0.25	0.1	0.03	0.2	0.22	0.21	0.37	0.34	0.23
SEXO	0.05	–	0.03	0.02	0.04	0.2	0.03	0.01	0.01	0.08	0.05	0.11	0.05
IDADE	0.15	0.03	–	0.05	0.01	0.14	0.08	0.01	0.12	0.11	0.15	0.1	0.02
RAÇA	0.2	0.02	0.05	–	0.01	0.19	0.03	0.1	0.02	0.15	0.24	0.31	0.18
PELO	0.25	0.04	0.01	0.01	–	0.1	0.05	0.05	0.02	0.04	0.04	0.13	0.06
ACESSO	0.1	0.2	0.14	0.19	0.1	–	0.15	0.19	0.07	0.3	0.27	0.33	0.22
RESID	0.03	0.03	0.08	0.03	0.05	0.15	–	0.23	0.07	0.44	0.2	0.26	0.19
GATOS	0.2	0.01	0.01	0.1	0.05	0.19	0.23	–	0.51	0.19	0.15	0.1	0.01
CAR	0.22	0.01	0.12	0.02	0.02	0.07	0.07	0.51	–	0.15	0.01	0.22	0.08
ABRIGO	0.21	0.08	0.11	0.15	0.04	0.3	0.44	0.19	0.15	–	0.08	0.29	0.16
HIG	0.37	0.05	0.15	0.24	0.04	0.27	0.2	0.15	0.01	0.08	–	0.33	0.23
VET	0.34	0.11	0.1	0.31	0.13	0.33	0.26	0.1	0.22	0.29	0.33	–	0.34
PARASI	0.23	0.05	0.02	0.18	0.06	0.22	0.19	0.01	0.08	0.16	0.23	0.34	–

Legenda: RESID: Animais que vivem dentro ou fora de casa; CAR: carrapatos; HIG: Condições de Higiene; VET: assistência veterinária; PARASI: Uso de parasiticida

Após a análise do modelo de regressão logística, o modelo final foi selecionado pelo valor AIC mais baixo (295,33). A idade foi incluída no modelo final de regressão logística, e os cães com menos de cinco anos de idade foram 2,12 vezes mais propensos a serem infectados pelo hemoparasita do que aqueles com mais de cinco anos de idade (OR = 2,12;  $p < 0,05$ ; IC: 1,13-3,96) (Tabela 4). O comprimento do pelo, o contato do gato e as variáveis de acesso ao meio ambiente foram incluídos no modelo final porque apresentaram valores de  $p$  mais baixos do que o estimado neste estudo (Tabela 1); no entanto, esses fatores não foram associados à infecção por *B. vogeli*. A variável de abrigo foi correlacionada com *B. vogeli* e os cães sem acesso ao abrigo eram 2,08 vezes mais propensos a serem infectados com *B. vogeli* (OR = 2,08;  $p < 0,05$ ; IC: 1,16-4,26) (Tabela 4). A infestação de tiques foi o fator que mais influenciou a infecção por *B. vogeli* em cães. Os cães com carrapatos foram 2,22 vezes mais propensos a serem infectados com *B. vogeli* (OR = 2,22;  $p < 0,05$ ; IC: 1,23-3,93) do que os cães sem infestação de carrapato no momento da coleta da amostra (Tabela 4). *R. sanguineus sensu lato* foi a principal espécie de carrapato no momento da coleta, mas também foram recolhidos alguns espécimes de *Amblyomma ovale*.

**Tabela 4.** Modelo de regressão logístico final dos fatores associados à infecção dos cães por *Babesia vogeli* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Variáveis Associadas	Análise Descritiva				Análise Multivariada				
	N	N +	N-	(%)	C (β)	SE	P	OR	IC 95%
<b>Idade</b>									
<5 anos	127	27	100	21%	0.63	0.31	0.05	2.12	1.13-3.96
>5 anos	263	28	235	11%	*	*	*	*	*
<b>Infestação de carrapatos</b>									
Sim	179	38	141	21%	0.84	0.32	0.05	2.22	1.23-3.93
Não	211	17	194	8%	*	*	*	*	*
<b>Abrigo</b>									
Sim	256	24	232	9%	*	*	*	*	*
Não	134	31	103	23%	0.83	0.32	0.05	2.08	1.16-4.26

Legenda: N: número de animais; (%): Percentual de positivos; C(β); Coeficiente do modelo; EP: Erro padrão; P: p-valor; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. \*Categoria de Referência.

## 5. DISCUSSÃO

A frequência encontrada na microrregião de Itaguaí foi de 14% (55/390), sendo observada uma frequência de 16.67% no município de Seropédica. Previamente ao presente estudo foi realizado uma análise epidemiológica do município de Seropédica por Vilela et al (2013) utilizando PCR em tempo real. A frequência observada neste estudo foi superior à observada no estudo de Vilela et al (2013) (11,9%). Essa cidade possui algumas características que favorecem a disseminação da doença, desse modo, sem o controle de medidas profiláticas é esperado que a frequência de animais positivos esteja maior devido. Em Seropédica, localiza-se a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que agrega em torno de 11.395 pessoas de diferentes Estados do Brasil que transportam com frequência seus animais de estimação da universidade para suas cidades natais e vice versa. Em acréscimo, dentro da Universidade existe um curso renomado de Medicina Veterinária e o Hospital Veterinário de pequenos animais, onde são atendidos dezenas de animais por dia. Por esse motivo muitas pessoas levam seus animais para serem tratados lá em busca de um atendimento clínico de excelência. Também ocorre com frequência o abandono de animais próximo ao Instituto de veterinária, no qual gera um grande número de animais errantes. Além disso, vários moradores da cidade possuem como hábito permitem que seus cães perambularem livremente pela cidade. Todos esses fatores facilitam a disseminação do vetor e com ele o hemoparasita.

Outro fator que influencia a frequência observada é a sensibilidade da qPCR usada por Vilela et al. (2013). A detecção de limites da técnica qPCR aplicada no estudo não estava disponível, o que pode ser maior do que o método utilizado neste estudo. Além disso, o uso de marcadores fluorescentes para o sistema de sonda de hidrólise permite uma maior especificidade na amplificação do produto, pois é necessário para o reconhecimento seguido de quebrar a sonda para liberar o fluoróforo (Heid et al., 1996).

No Brasil, *B. vogeli* é endêmico nas áreas urbanas, onde há uma alta prevalência de cães infestados com carrapatos *R. sanguineus sensu lato* (Passos et al., 2005). No entanto, nas áreas rurais e periurbanas, os cães são criados em espaços restritos na propriedade, que imitam a situação ocorrente nas áreas urbanas (Dantas-Torres et al., 2006). Dessa forma é esperado que haja diferença significativa entre as áreas rurais e urbanas. Não foi observada associação entre a presença de DNA de *B. vogeli* e os municípios de origem dos cães, indicando que a taxa de infecção em toda a área de

estudo era relativamente homogênea. O clima tropical do Brasil favorece o ciclo de vida e o movimento de *R. sanguineus* sensu lato quase todo o ano (Labruna, 2001), e isso mantém o nível endêmico de *B. vogeli*. As características ambientais observadas em todas as áreas de estudo foram semelhantes, o que pode ter favorecido a taxa de infecção homogênea por *B. vogeli* nos cães.

Nenhuma associação foi encontrada entre gênero ou raça com detecção de *B. vogeli*. Os resultados encontrados concordaram com estudos realizados por Maia et al. (2007) e Costa-Júnior et al. (2009), onde os autores também não relataram associação entre essas variáveis e a infecção por *B. vogeli*. No entanto, Dell'Porto (1986) observou uma prevalência significativamente maior em fêmeas e atribuiu essa descoberta ao puerpério. Durante este período, as fêmeas são sedentárias, o que facilita o parasitismo pelo vetor.

Neste estudo foi observado que os animais com menos de 5 anos de idade eram mais suscetíveis à infecção por *B. vogeli* (OR = 2,12;  $p < 0,05$ ; CI = 1,13-3,96). O sistema imunológico em animais jovens é imaturo, o que significa que eles ainda não possuem a capacidade total de produzir anticorpos para combater agentes patogênicos (Bashir et al., 2009). Rotondano et al., (2015) observaram que os cães jovens recém-desmamados são mais suscetíveis à doença devido ao estresse de adaptação à alimentação e ao meio ambiente. Esses dados foram semelhantes aos de outros estudos epidemiológicos realizados em diferentes países, como Itália (Solano-Gallego et al., 2008), Paquistão (Bashir et al., 2009), Zâmbia (Nalubamba et al., 2011) e Brasil (Rotondano et al., 2015). Embora os animais jovens sejam susceptíveis a infecção, os animais seniles também têm maior chance de serem infectados, já que o sistema imunológico desses animais se torna inerentemente mais frágil, colocando-os também em risco (Bashir et al., 2009).

A presença desses ectoparasitos foi fortemente correlacionada com a infecção por *B. vogeli* (OR = 2,22;  $p < 0,05$ ; IC = 1,23-3,93). *R. sanguineus* sensu lato é a espécie que transmite *B. vogeli* para cães no Brasil (Passos et al., 2005). Muitos relatórios destacam a presença dessas espécies de carrapatos em áreas urbanas e rurais (Labruna et al., 2001; Dantas-Torres, 2006). Devido à sua ampla distribuição no Brasil e à sua capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros, a presença de *R. sanguineus* sensu lato em cães foi o fator mais associado à infecção por *B. vogeli* neste estudo.

A variável de contato direto com gatos foi adicionada a este estudo porque influenciar a epidemiologia da babesiose canina, uma vez que os gatos podem ser um hospedeiro reservatório para *B. vogeli*. Apesar de *R. sanguineus sensu lato* possuir alta especificidade parasitária, em condições onde o hospedeiro preferido é escasso, o vetor pode parasitar outras espécies, como gatos, humanos e camundongos (Mendes-de-Almeida et al., 2011; Dantas-Torres et al., 2006; Winkel et al., 2014 ). Portanto, é possível que o vetor possa transmitir o patógeno através de gatos que tenham contato com cães, aumentando assim as chances de infecção. Neste estudo, o valor do qui-quadrado foi significativo ( $p < 0,01$ ). Portanto, esse fator foi incluído no modelo, mas não foi significativo na análise multivariada.

A ausência de abrigo foi considerada um fator de risco para a infecção por *B. vogeli* em cães (OR = 2,29;  $p < 0,05$ ; IC = 1,23–4,26). Os animais privados de abrigo são expostos a ambientes variados devido ao seu movimento constante (Santos et al., 2013). Portanto, a probabilidade de uma infestação de carrapatos é alta, tornando-os suscetíveis à infecção por *B. vogeli*. Os animais que vagam soltos ou são animais de trabalho geralmente pertencem a pessoas de baixa economia que não podem pagar cuidados veterinários (Maia et al., 2007). Pode haver uma relação indireta entre a falta de cuidados veterinários e a infecção por *B. vogeli* em cães, uma vez que esses animais geralmente vivem em condições precárias e não recebem nutrição adequada ou ectoparasiticida. A variável assistência veterinária foi significativa no teste do qui-quadrado. Esta correlação entre cuidados veterinários e infecção por *B. vogeli* em cães também foi observada por Araujo et al. (2015).

## 6. CONCLUSÃO

A análise epidemiológica de *B.vogeli* em cães na Microrregião de Itaguaí, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro, por análise de regressão logística múltipla revelou que cães com menos de cinco anos de idade, criados sem acesso ao abrigo e infestados com carrapatos, provavelmente apresentariam infecção por *B. vogeli*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO A.C., SILVEIRA J.A.G., AZEVEDO, S.S., NIERI-BASTOS F.A., RIBEIRO M.F.B, LABRUNA M.B., HORTA M.C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa veterinária brasileira* v.35, p.456-461. 2015.

AYRES, M; AYRES JÚNIOR, M; AYRES, DL; SANTOS, AS. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Tefé; 380p. 2007.

BASHIR, I.N., CHAUDHRY, Z.I., AHMED, S., SAEED, M.A. Epidemiological and vector identification studies on canine babesiosis. *Pakistan Veterinary Journal* v.29, p.51–54. 2009.

BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*. v.52, p.345-370. 1987.

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

BRINKHOF, B; SPEE B; ROTHUIZEN J; PENNING LC. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Analytical Biochemistry*. v.356, p.36-43. 2006.

BUSTIN SA; BENES V, GARSON JA; HELLEMANS J; HUGGETT J; KUBISTA M; MUELLER R; NOLAN T; PFAFFL MW; SHIPLEY GL; VANDESOMPELE J; WITWER CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* v.55.p.611-622. 2009.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal Eukaryotic Microbiology*, v.46, p.298-303, 1999

CENSO DEMOGRÁFICO 2010. Características gerais da população, religião e pessoas com deficiência. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Acompanha 1 CD-ROM. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo\_Demografico\_2010/Caracteristicas\_Gerais\_Religiao\_Deficiencia/caracteristicas\_religiao\_deficiencia.pdf>. Acesso em: dez. 2016.

COSTA-JÚNIOR L.M., RIBEIRO M.F., REMBECK K., RABELO E.M., ZÄHLER-RINDER M., HIRZMANN, J., PFISTER K. & PASSOS L.M.F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Veterinary Science*. v.86 p.257-260. 2009.

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA A, BARBA-CARRETERO, J.C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study *Veterinary Microbiology*. v.93, p.307–317. 2003.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*, v.1, p.1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A., BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* v.39, p.64–67. 2006.

DELL' PORTO A. Estudo da ocorrência de *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São Paulo. Ph D. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo. 1986.

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

HOMER MJ, AGUILAR-DELFIN I, TELFORD SR, KRAUSE PJ, PERSING DH. Babesiosis *Clinical Microbiology* v.13. p.451–69. 2000.

KUBELOVÁ, M; SEDLÁK, K; PANEV, A; ŠIROKÝ, P. Conflicting results of serological, PCR and microscopic methods clarify the various risk levels of canine babesiosis in Slovakia: A complex approach to *Babesia canis* diagnostics. *Veterinary Parasitology*. v.191, p.353–357. 2013.

JOJIMA FS, GARCIA JL, VIDOTTO MC, BALARIN MRS, FABRETTI AK, GASPARINI MR. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* v.17. p.277-283. 2008.

LABRUNA M.B. & PEREIRA M. Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária* v.30. p.4-32. 2001.

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

LIRA, S. A.; “Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações”. Curitiba, 2004. 196 p. Dissertação (mestrado). Setores de Ciências Exatas e de Tecnologia, UFPR.

LYMBERG, A.J.; THOMPSON, R.C.A. The molecular epidemiology of parasite infections: Tools and applications. *Molecular Biochemical Parasitology* v.181, p.102–116. 2012.

MACIEIRA, D. D. B., MESSICK, J. B., CERQUEIRA, A. D. M. F., FREIRE, I. M. A., LINHARES, G. F. C., ALMEIDA, N. K. D. O. AND ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, v.34 p.44–48. 2005

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

MARTIN A.R., DUNSTAN R. H. ROBERTS T.K., BROWN G. K. *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology* v.112. p.63-65. 2006.

MENDES-DE-ALMEIDA, F., CRISSIUMA, A.L., GERSHONY, L.C., WILLI, L.M.V., PAIVA, J.P., GUERRERO, J., LABARTHE, N., 2011. Characterization of ectoparasites in an urban cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758) population of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research* 108. 1431–1435, 2011.

MEDRONHO R. Epidemiologia. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 685p. 2009.

- MOSSARD, F. V.; SILVA, B. C. D.; BEZERRA, V. I.; LOPES, C. W. G. Estudo retrospectivo da babesiose em cães domiciliados na zona oeste do município do Rio de Janeiro, RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, Ribeirão Preto: CBPV, p. 355. 2006.
- MIRANDA, F. J. B.; ALBERNAZ, A. P.; MELO JÚNIOR, O. A.; MACHADO, J. A. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos de Goytacazes, RJ. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, p.238-241, 2008.
- MRLJAK, V; KULEŠ, J; MIHALJEVIĆ, Ž; TORTI, M; GOTIĆ, J;CRNOGAJ, M; ŽIVIČNJAK, T; MAYER, I; ŠMIT, I; BHIĐE, M; BARIĆ RAFAJ, R. Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Disease*. v.17, p.398–408. 2017.
- NALUBAMBA, K.S., HANKANGA, C., MUDENDA, N.B., MASUKU, M. The epidemiology of canine *Babesia* infections in Zambia *Preventive Veterinary Medicine*.v.99, p.240–244.2011.
- O'DWYER, L. H. & MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1ª ed. Rio de Janeiro. L. F. Livros de Veterinária LTDA. p. 57-67, 2002.
- O'DWYER, L. H. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*. v. 18. p. 23-26. 2009
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dog from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p.81-85, 2005.
- PAULINO, P.G., SANDES, M., BEZERRA, C., PECKLE, M., COSTA, R.L., VITARI, G.V., ABREU, A.M., MASSARD, C.L, SANTOS, H.A. Comparison of *heat shock protein 70 kDa* and *18S rDNA* genes for molecular detection and phylogenetic analysis of *Babesia vogeli* from whole blood of naturally infected dogs. *Tick Tick Borne Disease*2018. *In press*.
- PIRES, M.S. Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro. 2013.126p.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RIBEIRO M.F.B., PASSOS L.M.F., LIMA J.D. & GUIMARÃES A.M. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* v.42 p.511-517. 1990.

RIBEIRO M.J.M., GUIMARÃES A.M., BRUHN F.R.P., ROCHA C.M.B.M., FONSECA J.P., Soroprevalência de *Babesia vogeli* em um população canina hospitalar no sul de Minas Gerais In: Anais do *Congresso brasileiro de parasitologia veterinária*, Gramado, RS, 2014.

ROTONDANO, TEF; ALMEIDA, HKA; KRAWCZAK, FS; SANTANA, VL; VIDAL, IF; LABRUNA, MB; AZEVEDO, SS; ALMEIDA, AMP; MELO, MA. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Brazilian Journal. Veterinary Parasitology* v.24.p.52–58. 2015.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ. 265 p. 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction, *Journal Veterinary Diagnosis Investigation*. v.23, p.770-774, 2011.

SILVA AB, COSTA AP, DE SÁ JC, COSTA FB, DOS SANTOS ACG, GUERRA RMS. Molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs and in *Rhipicephalus sanguineus* from the middle-west region of Maranhão, northeast Brazil. *Ciência Animal Brasileira* v.13 p.388-395. 2012.

- SOLANO-GALLEGOS L, TROTTA M, CARLI E, CARCY B, CALDINI M, FURLANELLO T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, v.157. p.211–219. 2008.
- SOLANO-GALLEGOS L., SAINZ A., ROURA X., ESTRADA-PEÑA A., MIRÓ G. A review of canine babesiosis: the European perspective *Parasite and Vectors* v. 9. p. 336. 2016.
- SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamento e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 15, n. 1, p.13-16, 2006.
- UNGAR de SÁ, M. F. M.; UNGAR de SÁ, J. E.; BITTENCOURT, D. V. V.; BISPO, A. C.; RÉGIS, A. M. M.; SOUZA FILHO, N. J.; GOMES NETO, C. M. B.; SOUZA, B. M. P. S.; BITTENCOURT, T. C. C.; FRANKE, C. R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 8, p. 178-183, 2007.
- VILELA, J.A.R., PIRES, M.P., BEZERRA, C.S., PEIXOTO, M.P., FALQUETO, A., SANTOS, A.Z., SANAVRIA, A., MASSARD, C.L., FACCINI, J.L.H., Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* v.35. p.63-68. 2013.
- SCHOEMAN, J.P., 2009, 'Canine babesiosis', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* v.76, p.59–66.2009.
- SPOLIDORIO M.G., LABRUNA M.B., MACHADO R.Z., MORAES-FILHO J., ZAGO A.M., DONATELE D.M., PINHEIRO S.R., SILVEIRA I., CALIARI K.M. & YOSHINARI N.H. 2010. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine Hygiene* v.83. p.201-206. 2010.
- TABOADA J, HARVEY JW, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB. Seroprevalence of babesiosis in Greyhounds in Florida. *Journal Veterinary Medicine Association* v.200 p.47–50. 2000.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p. 177-180, 2006.

YAMASAKI, M; INOKUMA, H; SUGIMOTO, C; SHAW, SE; AKTAS, M; YABSLEY, MJ; YAMATO, O; MAEDE, Y. 2007. Comparison and phylogenetic analysis of the *heat shock protein 70* gene of *Babesia* parasites from dogs. *Veterinary Parasitology*. v.145.p.217–227. 2007.

WINKEL, K.T.; RIBEIRO, P.B.; ANTUNES, L.O.; CÁRCAMO, M.C.; VIANNA, E.E.S. 2014. *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Ixodidae) in synantropic rodents in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal Veterinary Parasitology* v.23. p.276-279. 2014.

VERCAMMEN, F., DEKEN, R.D., MAES, L. Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Veterinary Parasitology*. v.66, p.251–255. 1996.

## ANEXOS

Anexo I - Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo III – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.

Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Propriedade Nº \_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana

Localidade: \_\_\_\_\_ Coord. Geográf.: \_\_\_\_\_

Tutor: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Pt de referência: \_\_\_\_\_ Temperatura ambiente: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Tipo de residência: ( ) pau a pique ( ) alvenaria ( ) outros:

Tipo de vegetação predominante: \_\_\_\_\_

Quantos cães em casa: \_\_\_\_

Pratica alguma ação para controle de ectoparasitos?

( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Leva o cão ao veterinário?

( ) sim ( ) não Qual a Periodicidade? \_\_\_\_\_

Presença de outras espécies domésticas:

( ) gatos ( ) bovinos ( ) equinos ( ) outros: Quais? \_\_\_\_\_

Presença de animais silvestres:

( ) capivara ( ) gambá ( ) outros: \_\_\_\_\_

Condição econômica (observacional):

( ) baixa ( ) média ( ) alta

Escolaridade:

Nunca frequentou a escola ( )

Ensino fundamental incompleto ( )

Ensino fundamental completo ( )

Ensino médio incompleto ( )

Ensino médio completo ( )

Ensino superior completo/incompleto ( )

Que produtos de limpeza utiliza no ambiente?

\_\_\_\_\_

Utiliza prod. inseticidas no ambiente?

( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos?

\_\_\_\_\_

Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos?

\_\_\_\_\_

Outras observações relevantes:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL N° \_\_\_\_\_

Data: / / \_\_\_\_\_ Propriedade N° \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana Localidade:

\_\_\_\_\_

Tutor: \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea Raça: \_\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_

Animal nascido na propriedade? ( ) sim ( ) não

Se não, de onde veio o animal? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo está com o animal? \_\_\_\_\_

Pêlo: ( ) curto ( ) médio ( ) longo

Porte: ( ) peq ( ) méd ( ) grande

Escore: ( ) caquético ( ) magro ( ) normal ( ) obeso

Comportamento: ( ) triste ( ) ativo/normal ( ) agitado

Idade: ( ) <6 meses ( ) 6 meses a 2 anos ( ) 2 a 5 anos ( ) 5 a 10 anos ( ) > 10 anos

Temperatura: \_\_\_\_\_ Pulso: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_ TPC: \_\_\_\_\_ Turgor:

\_\_\_\_\_

Linfonodos: \_\_\_\_\_

Mucosa ocular: ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) ictérica ( ) congesta

Mucosa oral: ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) ictérica ( ) congesta

Outras alterações sanitárias atuais:

\_\_\_\_\_

Distúrbios atuais de coagulação na pele: ( ) petéquias ( ) equimoses ( ) outros:

\_\_\_\_\_

Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: ( ) sim ( ) não

Animal vive dentro da residência: ( ) sim ( ) não ( ) às vezes

Locais de acesso do animal: ( ) pastagens ( ) córregos ( ) matas ( ) ambiente urbano

Contato direto com outras espécies de animais: ( ) sim ( ) não Quais?

\_\_\_\_\_  
Histórico de patologias:

\_\_\_\_\_

Tipo de alimentação: ( ) comida ( ) ração

Possui água e comida à disposição o tempo todo? ( ) sim ( ) não

Vermifugação: ( ) sim ( ) não Há qto tempo? \_\_\_\_\_ Qual produto?

\_\_\_\_\_

Critério para escolha: ( ) indicação ( ) balconista ( ) veterinário ( ) propaganda

Possui ectoparasitos? ( ) sim ( ) não

Quais e quantidade?

( ) pulgas \_\_\_\_\_ ( ) piolhos \_\_\_\_\_ ( ) sarnas \_\_\_\_\_

( ) carrapatos \_\_\_\_\_ Fases: \_\_\_\_\_ espécies:

\_\_\_\_\_

Faz tratamento? ( ) sim ( ) não Qual produto? \_\_\_\_\_

Se não trata, qual motivo? \_\_\_\_\_

Critério para escolha do produto: ( ) indicação ( ) balconista ( ) veterinário ( ) propaganda

Dermatopatias? ( ) sim ( ) não

Outros tipos de lesões:

\_\_\_\_\_

Sinais de otite? ( ) sim ( ) não

Hábito do animal?

( ) sempre preso ( ) preso de dia e solto à noite ( ) solto ( ) outros

\_\_\_\_\_

Apresenta abrigo? ( ) sim ( ) não Tipo:

\_\_\_\_\_

Tipo de ambiente do animal:

( ) ladrilhado ( ) cimentado ( ) de terra ( ) outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: ( ) ruim ( ) moderada ( ) satisfatória

Frequência de recolhimento e limpeza das fezes:

diariamente  2 a 3 vezes por semana  1 vez por semana  não faz

Tem assistência Veterinária?  sim  não

Frequência?  a cada 6 meses  1 x por ano  só qd fica doente

Animal é vacinado?  sim  não Quais vacinas?

\_\_\_\_\_

Banho:  semanal  quinzenal  mensal  outros

Usa produtos parasiticidas?  sim  não Quais?

\_\_\_\_\_

Outras obs. relevantes:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada **Novas metodologias moleculares para detecção dos hemoparasitos Ehrlichia canis, Anaplasma platys e Babesia vogeli em cães e carrapatos**, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Patrícia Gonzaga Paulino e Huarrisson Azevedo Santos**. Nesta pesquisa nós estamos buscando novas técnicas para detectar o agente causador da **babesiose canina** no sangue de cães do Estado do Rio de Janeiro. Será coletado apenas uma vez por venopunção da veia cefálica 3mL de sangue para análise laboratorial. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Patrícia Gonzaga Paulino durante as visitas de cães domiciliados do estado do Rio de Janeiro. Na sua participação você, tutor do animal, concorda com a coleta de sangue do seu animal durante a visita para análise da amostra no laboratório de hemoparasitos e vetores da UFRRJ. O tutor do animal não será submetido a nenhum tipo de gravação ou filmagem. A pesquisa em questão pretende detectar a presença ou ausência do microrganismo no sangue do animal por meio de uma técnica sensível e específica chamada reação em cadeia polimerase (PCR). Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. O benefício será de ganhar o resultado do teste para presença de hemoparasito no sangue de seu animal totalmente gratuito. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

Patrícia Gonzaga Paulino

Médica Veterinária; Mestranda no programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela UFRRJ E-mails: patgpaulino@gmail.com Telefone: 21 2681-1617

Dr. Huarrisson Azevedo Santos

Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Ciências Veterinárias pela UFRRJ  
E-mails: huarrisson@ufrj.br Telefone: 21 2681-1617

Seropédica, ..... de .....de 2016.

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

Anexo III – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.



**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



Seropédica, 22 de junho de 2016

#### TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Huarrisson Azevedo Santos**, CPF 983.833.295-04, responsável pelo projeto intitulado: "Desenvolvimento de Reação em Cadeia com Deslocamento da Polimerase na detecção de Ehrlichia canis em cães naturalmente infectados no Estado do Rio de Janeiro.", declaro que:

- a) li o disposto na Lei n 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Responsável: Huarrisson Azevedo Santos