

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL DO PARASITISMO SANGUÍNEO POR ANÁLISES
MOLECULARES ENVOLVENDO *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* EM
CÃES SINTOMÁTICOS NA ÁREA METROPOLITANA DE GOIÂNIA,
GOIÁS**

Sabrina Castilho Duarte
Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland C. Linhares

Goiânia
2010

SABRINA CASTILHO DUARTE

**PERFIL DO PARASITISMO SANGUÍNEO POR ANÁLISES
MOLECULARES ENVOLVENDO *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* EM
CÃES SINTOMÁTICOS NA ÁREA METROPOLITANA DE GOIÂNIA,
GOIÁS**

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal junto
à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal e Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa

Parasitas e doenças parasitárias dos animais

Orientador:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares – UFG

Comitê de Orientação:

Prof^a Dr^a Lúgia Miranda Ferreira Borges – UFG

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - UFG

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

Duarte, Sabrina Castilho.
D812p Perfil do parasitismo sanguíneo por análises moleculares envolvendo *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* em cães sintomáticos na área metropolitana de Goiânia, Goiás [manuscrito] / Sabrina Castilho Duarte. - 2010.
79 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.
Bibliografia.

1. Diagnóstico de Hemoparasitos – Goiás (Estado) 2. *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* 3. *Babesiose canina* – Parasitologia
I. Título

CDU: 619:576.89:636.7

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente meu marido
Alexandre e minhas filhas Alice e
Beatriz por viverem comigo a
realização de sonhos pessoais e
profissionais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me capacitado, proporcionado todas as oportunidades e colocado em minha vida tantas pessoas e profissionais admiráveis;

Ao CNPq, por ceder bolsas de Doutorado aos programas de pós-graduação do País. Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFG por conceder-me a bolsa, possibilitando minha dedicação integral a este projeto.

A Márcia Barnabé, faculdades Objetivo por me receber no corpo docente da Universidade no início do doutorado quando ainda não havia bolsas disponíveis possibilitando não apenas recursos financeiros como também crescimento profissional e pessoal;

Ao laboratório de biologia molecular do ICB/UFG, em especial a Juliana Alves Parente, pessoa tão querida, que realizou os sequenciamento dos isolados deste estudo com muita disposição e competência. A professora Célia Soares por ceder não apenas o laboratório e equipe como também todo material necessário as reações de seqüenciamento;

Aos funcionários da creche/UFG que cuidaram da minha pequena Alice com tanto amor. Recém nascida ela cresceu com sorriso no rosto vivendo a dura rotina de um bebê que nasceu “no doutorado”. No espaço da creche, Alice conseguiu superar os momentos da minha ausência sempre muito feliz. Seu sorriso na minha chegada ficará eternamente marcado em minha lembrança e foi sempre bálsamo para qualquer cansaço;

À Minha família que se esforçou junto comigo por esta conquista. Amo e agradeço imensamente minhas queridas filhas Alice e Beatriz; mesmo com excesso de atividades conseguimos juntas vencer todas as dificuldades. Agradeço ao meu marido amado Alexandre de Lima que entendeu amorosamente tanto tempo dedicado a minha formação profissional me auxiliando em tudo que estava ao seu alcance;

As minhas irmãs, especialmente a Herika C. D. Fernandes que como uma mãe socorria sempre, auxiliando com a Alice, com minhas ansiedades e momentos de desânimo. Obrigada por ser tão presente em minha vida. A Danielha C. D. Jones por juntamente com Rory Jones contribuir na correção dos textos em língua Inglesa;

A minha mãe Marina Leite Castilho Duarte (*in memoriam*) por ter sido exemplo de vida pra mim. Exemplo de conduta e atitude perante a vida como mãe, esposa e profissional.

Ao meu eterno amigo e orientador Guido F. C. Linhares, que honra tê-lo como orientador. Aprendi muito ao seu lado que nunca poupou esforços para ensinar, sempre buscando a metodologia mais adequada, a informação mais segura, a melhor forma de escrever, incansável na busca da excelência. Aprendi tudo que sei de uma forma honrada e ética. Um dia sei que terei a oportunidade de orientar e neste momento espero ser tão competente como ele.

A querida amiga Lúcia M; F. Borges por ter sempre boas soluções e pela certeza de apoio certo e confiável;

A minha amiga Carla C. B. Louly pela identificação dos carrapatos deste estudo, por estar sempre por perto e pela certeza de ajuda segura.

Ao meu querido amigo, um pai para mim, professor Francisco Dias Filho pela torcida, apoio diário. Agradeço pelas conversas que tanto enriqueceram;

As queridas professoras Valéria Sá Jaime e Maria Auxiliadora Andrade por serem pessoas tão amáveis dispensando a todos carinho, auxílio e amizade. Agradeço por terem auxiliado na correção deste trabalho mesmo tendo vários outros trabalhos a serem corrigidos. Obrigada por terem atribuído importância e amor na correção desta tese.

As professoras, membros da banca de qualificação, Rosângela Zacarias Machado, Andrea Caetano da Silva, Lúcia M. F. Borges e Valéria de Sá Jaime e aos professores da banca de defesa professores: Carlos Luiz Massard, Abraão Garcia

Gomes e José Luiz Barros de Araújo especialmente pelas sugestões que tornaram este trabalho mais completo, claro e objetivo.

À UFG, especialmente ao Departamento de Medicina Preventiva. Agradeço à todos os funcionários pelo carinho de sempre;

Aos meus “irmãos” de trabalho “filhos” do mesmo orientador: Herika Xavier, Osvaldo José da Silveira Neto, José Carlos Favaro Junior e Fabrício O. Pereira e aos “primos” Alberto Elias Marques e Hilary Hidasí pela convivência saudável, pelo carinho de sempre e tantos ótimos momentos que passamos juntos.

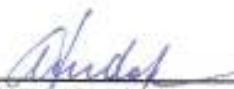
As minhas amigas de jornada Vanessa Silvestre, Marina Pacheco, Débora Melo, Paula Rogério e a querida Livia pelo apoio e amizade de sempre.

Finalizo agradecendo a Vida. Pelos bons momentos que nos alegram e pelos maus momentos que nos transformam.

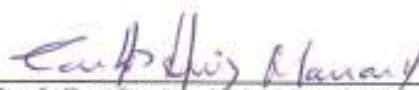
"Aquilo que você mais sabe ensinar, é
o que você mais precisa aprender..."
(RICHARD BACH)

SABRINA CASTILHO DUARTE

Tese defendida e aprovada em **31/03/2010** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:




Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Carlos Luiz Massard – UFFRJ/RJ



Prof. Dr. Abraão Garcia Gomes – IPTSP/UFG



Profa. Dra. Andrea Caetano da Silva – IPTSP/UFG(memória)



Prof. Dr. José Luiz de Barros Araújo – IPTSP/UFG

RESUMO GERAL

Nos gêneros *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* são posicionadas as espécies de parasitos responsáveis pela babesiose, ehrlichiose e hepatozoonose respectivamente. Estes microrganismos têm em comum o fato de serem transmitidos por carrapatos vetores e causarem nos cães infectados sinais gerais como febre, anemia e icterícia acompanhados de infecções intracelulares. No estado de Goiás não haviam trabalhos com abordagem filogenética relativos a estes hemoparasitos. O objetivo geral do presente trabalho foi realizar análise molecular de isolados de *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* obtidos de cães sintomáticos na cidade de Goiânia, Estado de Goiás, verificando assim qual a espécie e subespécie envolvida nas infecções. Para isto, foi realizado extração de DNA das amostras, seguido da realização de PCR com oligonucleotídeos genéricos. Após a PCR obteve-se fragmentos da região do 18S rRNA para as amostras de *Babesia* e *Hepatozoon* e do 16S rRNA para a pesquisa de espécies do gênero *Ehrlichia*. Os produtos de PCR obtidos foram purificados e utilizados para o sequenciamento. Foram seqüenciadas 35 amostras de *Babesia* spp. e destas 17 foram utilizadas para os estudos filogenéticos. Duas amostras de *Hepatozoon* spp. foram seqüenciadas e 17 amostras de *Ehrlichia* spp sendo que apenas cinco foram utilizadas para as análises. As análises de identidade realizadas com as amostras seqüenciadas permitiram a identificação de *B. canis vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia canis*. Quando confrontadas com as espécies e subespécies de referência de outras regiões do Brasil e do mundo apresentaram estreita similaridade molecular, o que demonstra a baixa variabilidade entre as diferentes amostras de diferentes regiões geográficas. Pela análise feita utilizando-se o programa MEGA4 e subsequente construção de árvores filogenéticas as amostras deste estudo formaram grupos próprios sempre em associação com as amostras de referência para as respectivas espécies. Dessa forma foi possível concluir que as amostras de *B. c. vogeli*, *H. canis* e *E. canis* provenientes de cães da cidade de Goiânia-GO apresentam estreita similaridade com isolados de outras regiões do mundo.

Palavras chave: babesiose, hemoparasitos, ehrlichiose, filogenia, hepatozoonose, PCR.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais.....	01
CAPÍTULO 2: ESTUDO FILOGENÉTICO DE <i>Babesia</i> spp. EM CÃES	10
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Hepatozoon</i> spp. PROVENIENTE DE CÃES SINTOMÁTICOS RESIDENTES EM AREA URBANA NA CIDADE DE GOIANIA GOIÁS, BRASIL.....	31
CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Ehrlichia canis</i> PRESENTE EM CÃES DE GOIÂNIA-GO.....	48
CAPÍTULO 5: Considerações Finais.....	65

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As hemoparasitoses de cães compõem um grupo de enfermidades de grande importância na Medicina Veterinária, atingindo animais de diferentes regiões do mundo. Seus vetores, os carrapatos, têm maior prevalência nas regiões de clima tropical e subtropical. Na região Centro-Oeste do Brasil são abundantes, o que favorece a ocorrência de altas taxas de incidência dessas enfermidades e condiciona o caráter endêmico das mesmas na região (LOULY, 2007; LESCHNIK et al., 2008).

Em todo o mundo os cães domésticos são acometidos por hemoparasitos, dentre eles os protozoários *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Theileria annae*, e *Hepatozoon canis*, e as rickettsias *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocitophilum*, *Neorickettsia sennetsu* e *Neorickettsia risticii* (GREENE, 2006).

No Brasil, os hemoparasitos com maior casuística são *B. canis*, *E. canis* e *H. canis*, os quais são transmitidos por carrapatos, sendo responsáveis por doenças caracterizadas por febre, anemia e inapetência (RUBINI et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

A *B. canis* e a *B. gibsoni* são as espécies mundialmente mais prevalentes em casos naturais de babesiose canina. De acordo com HOSKINS (1991) *B. canis* é um parasito do grupo das “grandes babesias”, sendo encontrada sob as formas de merozoítos e trofozoítos, ou ainda assumindo formas indiferenciadas que correspondem às diferentes fases do processo de divisão binária. Os merozoítos da *B. canis*, medem em torno de 2,4µm x 5,0µm quando observados microscopicamente e se apresentam aos pares, de um a oito, no interior das hemácias. *B. gibsoni* é um parasito pequeno, com tamanho de 1,0µm x 3,2µm, normalmente encontrado em formas isoladas no interior das hemácias.

A primeira descrição relativa à babesiose foi feita por Victor Babes, na Romênia, no final do século XIX, quando observou microrganismos no sangue de bovinos importados da África, que apresentavam hemoglobinúria e febre alta. O organismo observado foi denominado *Haematococcus bovis*. No ano de 1893,

Starcovicci reavaliou o parasito, denominando-o *Babesia bovis* em homenagem a Babes (KUTTLER, 1988).

Neste mesmo ano, os pesquisadores Smith & Kilborne estudando o agente da Febre do Texas, na América do Norte, diagnosticaram um agente semelhante ao descrito por Babes, que posteriormente foi denominado *Babesia bigemina*. Estes pesquisadores, pela primeira vez, estabeleceram a relação de transmissão de um protozoário por carrapato, na ocasião, o *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. Assim, sucessivamente, foram descritas *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. gibsoni*, *Babesia divergens*, *Babesia major*, *Babesia felis*, *Babesia ovata*, *Babesia canis*, entre outras (UILENBERG, 2006).

As babesioses têm importância mundialmente reconhecida, ora por prejuízos econômicos nas criações de animais de produção, ora por causar problemas de saúde a animais de companhia, e, em determinadas situações, afetar também o homem. O maior número de casos registrados de babesiose em humanos se deve a *B. microti* ocorrendo na América do Norte e *B. divergens* com maior frequência na Europa (KRAUSE et al., 2003).

E. canis, agente da Ehrlichiose Monocítica Canina, é uma bactéria Gram-negativa que normalmente infecta as células mononucleares sanguíneas, principalmente monócitos e linfócitos de cães, gatos e homem (DUMLER, et al., 2007). São caracterizados como organismos pequenos, pleomórficos, cocóides ou elipsoidais que ocorrem intracitoplasmaticamente de forma isolada ou formando uma inclusão compacta (mórula) em leucócitos circulantes dos hospedeiros vertebrados. As mórulas geralmente apresentam numerosos organismos individuais (KRIEG & HOLT, 1984).

A primeira descrição de do gênero *Ehrlichia* foi feita em cães infestados por carrapatos na Argélia, no ano de 1935, por Donatien & Lestoquard. A espécie observada foi denominada *Rickettsia canis*, porém em 1945 o parasito foi renomeado como *Ehrlichia canis*. Dentro do mesmo gênero foram observadas posteriormente as espécies: *Ehrlichia bovis*, *Ehrlichia ovina*, *Ehrlichia phagocithophila*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ondiri*, *Ehrlichia platys*, *Ehrlichia risticii*, *E. chaffeensis* e *Ehrlichia muris* (GREENE, 2006). A ehrlichiose por *E. canis* ganhou notoriedade no período da guerra do Vietnam (1968-1970) quando grande número de cães foi acometido pelo parasito

adoecendo com sinais hemorrágicos severos, resultando em altos índices de letalidade e mortalidade (RISTIC & HOLLAND, 1993).

Esta enfermidade tem grande importância na clínica de pequenos animais e saúde pública, já que é responsável por um grande número de casos de morbidade e óbitos de cães, sendo capaz também de acometer seres humanos (GREENE, 2006). As espécies responsáveis pela enfermidade em seres humanos são: *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, e *N. sennetsu*. No entanto DUMLER et al., (2007) considera que apenas as três primeiras espécies citadas são suficientemente investigadas. No Brasil os primeiros casos de ehrlichiose humana foram registrados por CALIC et al. (2004) e COSTA et al. (2007) com diagnóstico sorológico positivo para *E. chaffeensis* em indivíduos com sintomas sugestivos de ehrlichiose no estado de Minas Gerais.

Com relação ao gênero *Hepatozoon* duas espécies são conhecidas como causadoras de doença nos cães o *Hepatozoon canis* e o *Hepatozoon americanum*. Estes agentes apresentam duas fases de desenvolvimento, uma na corrente sanguínea e outra nos tecidos do hospedeiro vertebrado. Na fase sanguínea é possível observar os gametócitos que possuem forma elipsóide e medem aproximadamente 11x4µm, são envolvidos em uma membrana bem fina e geralmente se situam no centro do neutrófilo, comprimindo seu núcleo lobulado contra a membrana celular. A análise morfológica não possibilita a diferenciação entre as espécies (WANER et al., 1994).

Na fase tecidual o primeiro ciclo esquizogônico do *H. canis* ocorre na parede intestinal dos cães. Dois tipos de merontes são formados, um contendo macromerozoítos que dão origem a novas formas esquizogônicas, e outro, contendo micromerozoítos, que originam os gametócitos circulantes após penetrarem nos leucócitos. Os merontes maduros possuem de dois a quatro grandes macromerozoítos ou mais de 20 micromerozoítos. Em infecções por *H. canis* os merontes são mais observados em órgãos parenquimatosos, sendo raramente encontrados na musculatura. Já nas infecções por *H. americanum*, os merontes são principalmente encontrados nos músculos (MASSARD, 1979, BANETH et al., 2003).

A primeira espécie de *Hepatozoon* foi observada em 1905 por Bentley na Índia ao examinar células polimorfonucleares de cães seguida da descrição de

James no mesmo ano. A designação do nome *Hepatozoon canis* foi estabelecida por Wenyon em 1910 (GREENE, 2006).

A hepatozoonose acomete cães e várias outras espécies de animais em várias regiões do mundo, tendo sido descrita na Ásia, África, sul da Europa, e Américas do Norte e Sul (EWING ET AL., 2000, SPOLIDORIO et al., 2009). Estudos epidemiológicos no Brasil têm demonstrado taxas variadas de prevalência em cães de vários estados, incluindo Rio de Janeiro, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (MASSARD, 1979; MUNDIN et al., 1992; O'DWYER et al., 2001; RUBINI et al., 2005).

O diagnóstico clínico das hemoparasitoses é quase sempre inconclusivo quanto à doença específica uma vez que os cães parasitados apresentam sinais gerais como febre, anemia, inapetência e prostração geralmente associados a presença de carrapatos fixados nos animais parasitados.

O diagnóstico laboratorial das hemoparasitoses pode ser realizado por exames diretos e indiretos. O método direto é o mais utilizado na rotina diagnóstica e baseia-se na observação microscópica do parasito em esfregaço sanguíneo do animal em lâmina devidamente fixada e corada com preparações tinturiais com base Romanovsky, como o Giemsa, Wright, Leishman, Rosenfeld ou Panótico (KEER, 2003). Os métodos indiretos baseiam-se principalmente em exames sorológicos para pesquisa de anticorpos.

O exame microscópico direto é o método convencional empregado para detecção destes parasitos nos animais, entretanto, nem sempre é conclusivo para a diferenciação entre espécies ou subespécies morfológicamente semelhantes. Além disso em infecções de fase crônica onde a parasitemia é baixa, o exame microscópico pode oferecer baixa sensibilidade. Assim sendo, a partir da década de 1990, houve um incremento expressivo na adoção de técnicas de biologia molecular para a detecção e identificação precisa das espécies ou subespécies de hemoparasitos, especialmente em condições de baixa parasitemia ou em situações onde a morfologia não é conclusiva (ZHALER et al., 1998).

Entre as técnicas de biologia molecular a mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta é uma técnica que apresenta especificidade e sensibilidade elevadas, sendo capaz de detectar fragmentos-alvo do agente em amostras de sangue ou em outro tipo de amostra clínica, estando ou não os

parasitos viáveis (LAUERMAN, 1998). A PCR é o método de diagnóstico mais apropriado para a confirmação do diagnóstico de infecções na fase crônica da enfermidade. Além disso, é capaz de identificar o agente envolvido na infecção por espécie ou mesmo de subespécie (MARTIN et al., 2005).

Os avanços na utilização das técnicas moleculares têm implicações importantes em muitas áreas da parasitologia, possibilitando maior esclarecimento, identificação precisa do parasito e novas abordagens no controle do parasitismo. Estudos que proporcionam a caracterização genética dos microrganismos têm fornecido informações a respeito de taxonomia e filogenia auxiliando nos estudos de ecologia, genética de populações e epidemiologia. As técnicas moleculares dessa forma são ferramentas que suprem as limitações das técnicas convencionais de diagnóstico, identificação e diferenciação de microrganismos (GASSER, 2006).

Para o desenvolvimento de estudos sobre caracterização genotípica de microrganismos frequentemente é utilizado o sequenciamento genético, preferencialmente de genes que mantêm alto grau de conservação dentro do gênero avaliado e que apresentem sequências de nucleotídeos longas. Na realização de estudos evolutivos sobre *Babesia* e *Hepatozoon* tem sido frequentemente utilizadas sequências do gene 18S rRNA e, nos parasitos do gênero *Ehrlichia*, o gene 16S rRNA (CARRET et al., 1999, ALLSOPP & ALLSOPP, 2006).

DUMLER et al. (2001), com base em estudos genéticos envolvendo genes de proteínas de superfície e genes de choque térmico groESL, reorganizaram o gênero *Ehrlichia*. Na nova classificação as espécies *E. phagocitophila*, *E. platys* e *E. bovis* passaram a pertencer ao gênero *Anaplasma* e a serem denominadas *Anaplasma phagocitophilum*, *A. platys* e *A. bovis*, respectivamente. As espécies *E. risticii* e *E. sennetsu*, que anteriormente pertenciam ao gênero *Ehrlichia*, foram incluídas no gênero *Neorickettsia*. Esse trabalho mostra a importância dos métodos baseados em técnicas de biologia molecular, identificação e classificação taxonômica de microrganismos.

Outro exemplo sobre a aplicação de técnicas moleculares no estudo de hemoparasitos é o estudo realizado por NEIMARK et al. (2001). Os autores, após o sequenciamento do gene 16S rRNA das espécies dos gêneros

Haemobartonella e *Eperythrozoon*, realizaram análises das características morfológicas, que permitiram a reclassificação das mesmas pela remoção da ordem Rickettsiales para a classe Mollicutes. Dessa forma, os microrganismos foram renomeados como *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Mycoplasma haemosuis*.

Os estudos genéticos realizados com auxílio de técnicas moleculares possibilitam não apenas a reclassificação de microrganismos como também o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico oferecendo ferramentas mais seguras e de rápida execução. As informações obtidas podem ser utilizadas em estudos de resistência a drogas, análise do metabolismo de microrganismos patogênicos, variantes antigênicos, desenvolvimento de vacinas e ainda oferecem respaldo ao confronto de informações de diferentes regiões do mundo, validando assim os estudos realizados (ALLSOPP & ALLSOPP, 2006; CARRET et al., 2009)

A realização de estudos dessa natureza é necessária e importante para gerar maior conhecimento científico sobre os hemoparasitos, podendo não apenas contribuir para o esclarecimento da epidemiologia das enfermidades por eles causadas aos animais domésticos como também trazer informações que possam elucidar os possíveis riscos relativos à saúde animal e humana.

O objetivo geral do trabalho foi realizar estudo filogenético de isolados de *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* obtidos de cães com sintomatologia compatível com hemoparasitose canina na cidade de Goiânia, Estado de Goiás.

Referências Bibliográficas

1. ALLSOPP, M.T.E., ALLSOPP, B. Molecular sequence evidence for the reclassification of the some *Babesia* species. **Annals of New York Academic of Sciences**. n.1081. p.509-517, 2006.
2. BANETH, G.; MATHEW, J.S., SKHAP, V., MACINTIRE, D.K., BARTA, J.R., EWING, S.A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitology**. v. 19, n.01, 2003.
3. CALIC, S.B., GALVAO, M.A.M., BACELLAR, F., ROCHA, C.M.B.M., MAFRA, C.L., LEITE, R.C., WALKER, D.A. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p.259-262, 2004.
4. CARRET, C., WALAS, F., CAREY, B., GRANDE, N., PRECIGOUT, E., MOUBRI, K., SCHETTERS, T.P., GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*,

Babesia canis vogeli, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, p.298–303, 1999.

5. COSTA, J.R., REMBECK, K., RIBEIRO, M.F.B., BEELITZ, O., PFISTER, K., PASSOS, L.M.F. Sero prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**. v. 174, p.673-676, 2007.
6. DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Stanford: High Wire Press, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
7. DUMLER, J.S., MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. **Clinical Infectious Diseases**. v.45, p. 45-51, 2007.
8. EWING S.A.; PANCIERA R.J.; MATHEW JS.; CUMMINGS CA.; KOCAN KM. American canine hepatozoonosis: an emerging disease in the New World. **Annals of New York Academic Science**, v.916, p.81-92, 2000.
9. GASSER, R.B. Molecular tools—advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 69–89, 2006.
10. GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Canada: Copyright Elsevier, 2006. p. 203-232.
11. HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: Saunders Company, v.21, n.01, 1991. 201p.
12. KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária bioquímica clínica e hematologia**. São Paulo: Roca, 2003, 436p.
13. KRAUSE, P.J., MCKAY, K., GADBAW, J., CRISTIANSON, D., CLOSTER, L., LEPORE, T., TELFORD, S.R., SIKAND, V., RYAN, R., PERSING, D., RADOLF, J.D., SPIELMAN, A. Increasing health burden of human babesiosis in endemic sites. **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 68, p. 431-436, 2003.
14. KRIEG, N.R., HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. volume 1. Estados Unidos: Williams & Wilkins, 1984, 963p.

15. KUTTLER, K. L. World-wide impact of Babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 1-22.
16. LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1998. 152 p.
17. LESCHNIK, M., KIRTZ, G., TICHY, A., LRIDINGER, E. Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. **International Journal of Medical Microbiology**, v.298, S1, p.243-248, 2008.
18. LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., LINHARES, G. F. C., MENEZES, L. BORGES, L. M. F. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em cães de uma unidade da polícia de Goiânia, Goiás, Brasil**. **Ciência Animal Brasileira**, v. 37, n.2, p. 464-469, 2007.
19. MARTIN, A.R., BROWN, G.K., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K. Anaplasma platys: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**. v. 109, p. 176-180, 2005.
20. MASSARD, C.A. **Hepatozoon canis (JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora**. Rio de Janeiro, 1979. 121f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Biologia D.B.A. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.
21. MUNDIM, A.V.; JACOMINI, J.O.; MUNDIM, M.J.S.; ARAÚJO, S.F. **Hepatozoon canis (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos**. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p.259-261, 1992.
22. NEIMARK H, JOHANSSON KE, RIKIHISA Y, TULLY JG. Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. n.51, p.891-899, 2001.
23. O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; PEREIRA DE SOUZA, J.C. **Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil**. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.143-150, 2001.
24. RISTIC, M., HOLLAND, C.J. Canine Ehrlichiosis in **Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals**. RISTIC, M., WOLDEHIWET, Z. Oxford: England. 1993. 427p.

25. RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; CAVALCANTE, G.G.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v.97, p.91-93, 2005.
26. RUBINI, A.S., PADUAN, K.S., MARTINS, T.F., LABRUNA, M.B., O'DWYER, L.H. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, n.164, p. 324-327, 2009.
27. SANTOS, F., COPPEDE, J.S., PEREIRA, A.L.A., OLIVEIRA, L.P., ROBERTO, P.G., BENEDETTI, R.B.R., ZUCOLOTO, L.B., LUCAS, F., SOBREIRA, L., MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirao Preto, Brazil. **Veterinary Parasitology**. n.179, p.145-148, 2009.
28. SPOLIDORIO, M.G., LABRUNA, M.B., ZAGO, A.M., DONATELE, D.M., CALIARI, K.M., YOSHINARI. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Spirito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, n.163, p.357-361, 2009.
29. UILENBERG, G. *Babesia* - a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.3-10. 2006.
30. WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. *Hepatozoon canis*: Size measurement of gametocyte using image analysis technology. **Comparative haematology international**, v.4, p.177-179, 1994.
31. 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.

Minas Gerais, o que aponta para a necessidade e a importância do emprego de métodos moleculares em estudos envolvendo este tema.

5.0 CONCLUSÕES

1) Análises de similaridade molecular e testes espécie-específicos de PCR identificaram a espécie *E. canis* entre diferentes amostras clínicas provenientes de cães no município de Goiânia.

2) A análise filogenética permitiu a conclusão de que os isolados de *E. canis* provenientes da cidade de Goiânia – GO, apresentam estreita similaridade com isolados de *E. canis* das demais regiões do Brasil e outras regiões do mundo.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 489-493, 2008.
2. AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A., RUIZ, L., AMUSATEUGUI, I., SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 53, n.4, p. 197-200. 2006.
3. ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
4. ALVES, L.M; LINHARES, G.F.C; CHAVES, N.S.T; MONTEIRO, L.C; LINHARES, D.C.L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.
5. BULLER, R.S., ARENS, M., HMIEL, S.P., PADDOCK, C.D., SUMNER, J.W., RIKIHISA, Y., UNVER, GALDREAULT, K.E.E.N.E.R., MANIAN, F.A., LIDDELL, A.M., Schmulewitz, N., Storch, G.A. *Ehrlichia ewingii* recognized agent of human ehrlichiosis. **New England Journal of medicine**, v.341, p. 148–155, 1999.
6. CALIC, S.B., GALVAO, M.A.M., BACELLAR, F., ROCHA, C.M.B.M., MAFRA, C.L., LEITE, R.C., WALKER, D.A. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p.259-262, 2004.

7. CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.
8. COSTA, J.R., REMBECK, K., RIBEIRO, M.F.B., BEELITZ, O., PFISTER, K., PASSOS, L.M.F. Sero prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**. v. 174, p.673-676, 2007.
9. DAGNONE, A.S., MORAIS, H. S.A., VIDOTTO, O. Ehrlichiose nos animais e no homem. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 191-201, 2001.
10. DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, p. 285-290, 2003.
11. DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; Rurangirwa, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Stanford: High Wire Press, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
12. DUMLER, J.S., MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. **Clinical Infectious Diseases**. v.45, p. 45-51, 2007.
13. GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Canada: Copyright Elsevier, 2006. p. 203-232.
14. GREIG, B., BREITSCHWERDT, B., ARMSTRONG in GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Canada: Copyright Elsevier, 2006. p. 203-232.
15. HARRUS, S., WANER, T., KEYSARY, A., AROCH, I., VOET, H., BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, p. 15-27, 1998.
16. HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G.; BARAT, N. C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J. S. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1303-1304, 2006.
17. HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: Saunders Company, 1991, v.21, n.01, p.201-203.

18. LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-95, 2007.
19. MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.J.P. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v.139, p.262-266, 2006.
20. MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. D. E, M.; FREIRE, I. M.; LINHARES, G. F.; ALMEIDA, N. K.; ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p.44-48, 2005.
21. MARTIN, A.R., BROWN, G.K., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, p. 176-180, 2005.
22. OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, A.M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, S2, p.55-56, 2009.
23. PEREZ, M., RIKIHISA, Y., WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal Clinical of Microbiology**. v. 34, p. 2133–2139, 1996.
24. PINYOOWONG, D., JITTAPALAPONG, S., SUKSAWAT, F., STICH, R.W., THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, p.433–438, 2008.
25. RIPOLI, C.M., REMONDEGUI, C.E., ORDONEZ, G., ARAZAMENDI, R., FUSARO, H., HYMAN, M.J., PADDOCK, C.D., ZAKI, S.R., OLSON, J.G., SANTOS-BUCH, C.A. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v.61, p.350–354, 1999.
26. SANTOS F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

27. TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** v.24:p.1596-1599.2007.
28. THOMPSON, J. D. et al. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. **Nucleic Acids Research**, v.27, n.13, p.2682-9260, 1999.
29. WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. In: HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. p. 75-98.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é o primeiro estudo filogenético de *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* desenvolvido com amostras de origem canina no estado de Goiás. Possibilitou a identificação das espécies de parasitos presentes nos animais atendidos no HV da UFG da escola de veterinária durante o período de janeiro a agosto de 2008 e a verificação de similaridade existente entre estas amostras e cepas de outras regiões do mundo.

Anteriormente, a identificação dos hemoparasitos era realizada unicamente com base na morfologia, pela avaliação dos parâmetros e formas intracelulares observadas nos esfregaços sanguíneos de animais vertebrados infectados. Este diagnóstico, juntamente com a avaliação da especificidade do hospedeiro (vertebrado e invertebrado), forneceu meios para a classificação de várias espécies e estes critérios foram os únicos adotados até recentemente.

Há pouco mais de 10 anos, os parâmetros de identificação passaram a ser reavaliados e dessa forma, além dos dados já conhecidos, foram agregadas informações moleculares que contribuíram para uma melhor compreensão da filogenética dos hemoparasitos e a denominação de novas espécies, até o momento desconhecidas. As ferramentas moleculares devem ser consideradas como acessórias à microscopia direta, pois sua fundamental importância se dá pela capacidade em detectar e identificar precisamente as espécies e subespécies de hemoparasitos, especialmente em condições de baixa parasitemia ou em situações onde a morfologia não é conclusiva.

No presente trabalho foram identificadas espécies de hemoparasitos que coincidem com as espécies identificadas por outros trabalhos desenvolvidos no Brasil. Na pesquisa dos agentes do gênero *Babesia* identificou-se a subespécie *B. canis vogeli*. Na do gênero *Hepatozoon* a espécie *H. canis* e do gênero *Ehrlichia* foi identificada a *E. canis*.

Com base em informações nas pesquisas relacionadas a hemoparasitos desenvolvidas em diferentes regiões do mundo entende-se que a relação parasito-hospedeiro parece ser menos restrita do que se acreditava em estudos

anteriores e que espécies de hemoparasitos podem causar infecções em diferentes hospedeiros, sejam animais domésticos, silvestres ou seres humanos.

Os resultados aqui obtidos proporcionaram conhecimentos importantes para o esclarecimento da etiologia e epidemiologia dos agentes da babesiose, ehrlichiose e hepatozoonose canina ocorrentes em cães da microrregião de Goiânia-GO. As informações obtidas servirão de base para nortear novas pesquisas científicas voltadas a estudos epidemiológicos, clínico-patológicos e terapêuticos.

Considerando a ampla variedade de animais silvestres no Brasil que podem servir como reservatórios para as riquetssias e prozoários que determinam a infecção em seres humanos, os estudos relativos a estes agentes tornam-se importantes na saúde pública.

Neste estudo não foram identificados agentes reconhecidos como zoonóticos. Contudo, o desenvolvimento do trabalho propiciou a adoção e aplicação de técnicas que podem agora ser utilizadas em futuras pesquisas com este fim.

Conhecendo-se os reais agentes patogênicos e oferecendo informações genéticas a respeito dos mesmos é possível classificar genes que propiciem a infectividade do mesmo e criar métodos para silenciar genes que determinem sua patogenicidade. Além disso, a disponibilidade de informações acerca das hemoparasitoses na região de Goiânia pode ainda contribuir para o esclarecimento dos reais agentes zoonóticos e possíveis riscos à saúde humana no município.

As informações obtidas neste trabalho inserem o Estado de Goiás no âmbito da pesquisa filogenética mundial, já que as sequências disponibilizadas no banco de dados mundial, o *GenBank*, podem ser agora utilizadas por diferentes pesquisadores em todo o mundo. Os dados gerados são de grande importância, pois oferecem informações de isolados brasileiros que podem ser confrontados com isolados de outras regiões do País. Até recentemente não havia informações disponíveis de isolados brasileiros, sendo possível a realização de estudos utilizando-se apenas isolados de outras regiões do mundo. Entende-se que estas informações podem não ser suficientes, tanto pela grande extensão territorial do Estado, quanto pelo grande número de animais suscetíveis aos patógenos

avaliados, mas são fundamentais para gerar uma biblioteca de dados que norteiem pesquisas futuras.

O trabalho colaborou para a disponibilização e adoção de técnicas moleculares para fins de pesquisa e extensão no âmbito da Escola de Veterinária da UFG, o que também possibilitará a transferência de tecnologia a alunos da Universidade e parceiros de outras instituições.

A execução do projeto contribuiu ainda para o treinamento e capacitação na técnica de seqüenciamento de amostras de DNA, técnica esta que tem possibilitado avanços importantes no conhecimento científico sobre a natureza dos microrganismos. Além disso, foi possível obter informações acerca da construção de árvores filogenéticas, interpretação e processamento dos dados fornecidos pelo sequenciador automático, aspecto fundamental, uma vez que o processamento destes dados é o grande entrave no desenvolvimento de estudos com esta finalidade.

Acredita-se que novos estudos se façam necessários, considerando-se a importância de serem coletados dados sobre um número cada vez maior de isolados e a disponibilização de informações de diferentes regiões do Brasil. Da mesma forma trabalhos associando transmissão experimental e biologia molecular são fundamentais no sentido de se obter informações a respeito das espécies e possíveis genogrupos ocorrentes no Brasil.