



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Babesia*
gibsoni EM CÃO NO DISTRITO FEDERAL

MATHEUS ALMEIDA DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Babesia*
gibsoni EM CÃO NO DISTRITO FEDERAL

MATHEUS ALMEIDA DUARTE

ORIENTADORA: PROF. DRA. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2024

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA**

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Babesia*
gibsoni EM CÃO NO DISTRITO FEDERAL

MATHEUS ALMEIDA DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:

GIANE REGINA PALUDO, Doutora (UNB)
(ORIENTADORA)

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ, Doutor (UNESP)
(EXAMINADOR EXTERNO)

ANGELA PATRÍCIA SANTANA, Doutora (UNB)
(EXAMINADOR INTERNO)

BRASÍLIA/DF, 19 de FEVEREIRO de 2025

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DUARTE, M. A. **Identificação e caracterização molecular de *Babesia gibsoni* em cão no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, x p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

DUARTE, M. A. **Identificação e caracterização molecular de *Babesia gibsoni* em cão no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2024, x p. Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Ciências Animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024.

1. Canis lupus familiaris 2. Rede de haplótipos 3. PCR 4. Filogenia molecular

AGRADECIMENTOS

São muitas pessoas que fizeram parte da trajetória que me trouxeram até aqui e gostaria de agradecê-las. Primeiramente, agradecer à minha família que me proporcionou poder estudar na UnB, tanto fazer a graduação, a residência e agora o mestrado. Tive experiências incríveis durante esse período, não só de muito aprendizado com as aulas, mas com os estágios e com os projetos de pesquisa.

Agradecer em especial à minha orientadora Giane Regina Paludo por todo a orientação e estímulo ao longo da graduação, da residência e do mestrado, e por todas as oportunidades de aprendizado. Agradeço também aos meus amigos e colegas, que me apoiaram ou me ajudaram de alguma forma. Gostaria de destacar atenção a quem participou ou esteve mais diretamente ligado a mim e a este trabalho durante esse tempo, então gostaria de demonstrar meu carinho ao Flávio Hauila pelo companheirismo ao longo desses anos ao meu lado, a Stephanie Carrolliny por todo o apoio e compreensão, a Thais Fernandes, que participou ativamente desse trabalho assim como a Marcela Scalón, a Larissa Vitória pela amizade e incentivo, e a Thais Sermoud por todas as ajudas e mimos.

Esse trabalho também não teria sido possível sem a ajuda e participação dos veterinários (Carol, Fil, Jaque, Talita) e técnicos (Ge, Paty, Talita) do laboratório Citopet, com um agradecimento especial a Fernanda Velasque.

E por fim sou grato à Universidade de Brasília, por tudo que ela representa e proporciona, e que permitiu o meu crescimento pessoal e profissional.

ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTAS DE TABELAS E QUADROS.....	X
CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura.....	
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 OBJETIVOS GERAIS	13
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Taxonomia e Filogenia molecular	14
2.2. Ciclo Biológico	18
2.3. Epidemiologia	20
2.4. Patogenia e Sinais Clínicos.....	23
2.5. Diagnóstico	24
2.6. Tratamento e Profilaxia.....	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
 CAPÍTULO 2 – Identificação e caracterização molecular de <i>Babesia gibsoni</i> em cão do Distrito Federal	
RESUMO.....	34
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1. Amostra Biológica.....	37
2.2. Análises.....	37
3. RESULTADOS	
3.1. Avaliação Clínica e Laboratorial.....	42
3.2. Ensaio Molecular por PCR.....	44
3.3. Análises Filogenéticas e de Identidade.....	44
3.4. Redes de Haplótipos e Índices de Diversidade.....	47
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

A babesiose canina é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia*, hemoparasitas importantes na clínica veterinária de cães. *Babesia vogeli* é a espécie predominante no Brasil. Contudo, *Babesia gibsoni*, comumente encontrada na Ásia e nos Estados Unidos, tem sido reportada como um agente emergente e possui características distintas quanto ao diagnóstico, tratamento, profilaxia e prognóstico. No presente estudo, é relatado o primeiro caso de *B. gibsoni* no Brasil confirmado por dados clínico-laboratoriais, moleculares e morfológicos. Um cão da raça Dachshund no Distrito Federal apresentou sinais inespecíficos, incluindo febre, desidratação e anemia persistente. A infecção para piroplasmídeo foi confirmada por PCR para o gene 18S rRNA e posteriormente o agente foi caracterizado com o uso de quatro marcadores moleculares (*cytb*, *cox3*, *hsp70* e 18S rRNA). Análises filogenéticas e de identidade confirmaram a espécie do isolado como *B. gibsoni*. Redes de haplótipos foram construídas e índices de diversidade calculados. Eles apontaram para uma diversidade genética importante dentro da espécie. O isolado brasileiro se agrupou no haplótipo dominante para o gene 18S rRNA. A mesma rede revela uma possível expansão populacional recente do agente. Os genes *cytb* e *cox3* demonstraram ser marcadores com alta variabilidade genética, sendo adequados para análises de diversidade intraespecífica. Os achados observados sugerem a possibilidade de que infecções por *B. gibsoni* possam estar sendo subdiagnosticadas no Brasil. O protocolo terapêutico utilizado no presente estudo, baseado em dipropionato de imidocarb e azitromicina, não foi eficaz na eliminação do parasita, corroborando a necessidade de abordagens de tratamento distintas daquelas utilizadas para *B. vogeli*. Além disso, com base na diversidade genética e distribuição global desse agente, sugere-se que estudos epidemiológicos, filogenéticos e filogeográficos sejam realizados para compreender a distribuição e impacto desse agente no país. Este estudo reforça a importância da vigilância molecular na babesiose canina e destaca *B. gibsoni*, um patógeno emergente, como um diagnóstico diferencial a ser considerado na clínica de cães no Brasil.

Palavras-chave: *Canis lupus familiaris*, Rede de haplótipos, PCR, Filogenia molecular

ABSTRACT

Canine babesiosis is a disease caused by protozoa of the genus *Babesia*, an important hemoparasite in veterinary clinical practice. *Babesia vogeli* is the predominant species in Brazil. However, *Babesia gibsoni*, commonly found in Asia and the United States, has been reported as an emerging pathogen with distinct characteristics regarding diagnosis, treatment, prophylaxis, and prognosis. In the present study, we report the first confirmed case of *B. gibsoni* in Brazil, based on clinical, laboratory, molecular, and morphological data. A Dachshund dog from the Federal District presented with nonspecific clinical signs, including fever, dehydration, and persistent anemia. *Babesia* infection was confirmed by PCR targeting the 18S rRNA gene, and the agent was further characterized using four molecular markers (*cytb*, *cox3*, *hsp70*, and 18S rRNA). Phylogenetic and sequence identity analyses confirmed the species as *B. gibsoni*. Haplotype networks were constructed, and diversity indices were calculated, revealing significant genetic variability within the species. The Brazilian isolate clustered within the dominant haplotype for the 18S rRNA gene. The same network suggests a possible recent population expansion of the pathogen. The *cytb* and *cox3* genes exhibited high genetic variability, demonstrating their suitability as markers for intraspecific diversity analyses. The findings suggest that *B. gibsoni* infections may be underdiagnosed in Brazil. The therapeutic protocol employed in this study, based on imidocarb dipropionate and azithromycin, was ineffective in eliminating the parasite, reinforcing the need for treatment strategies distinct from those used for *B. vogeli*. Furthermore, given the genetic diversity and global distribution of this pathogen, epidemiological, phylogenetic, and phylogeographic studies are warranted to better understand its occurrence and impact in the country. This study underscores the importance of molecular surveillance in canine babesiosis and highlights *B. gibsoni*, an emerging pathogen, as a differential diagnosis in the clinical assessment of dogs in Brazil.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, Haplotype network, PCR, Molecular phylogeny

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Árvore filogenética por máxima verossimilhança da ordem Piroplasmida com base no gene 18S rRNA.....	15
Figura 2 - Presença de <i>Babesia vogeli</i> , uma grande babesia (A), e de <i>Babesia conradae</i> , uma pequena babesia, em esfregaço sanguíneo.....	17
Figura 3 - Ciclo biológico das babesias pertencentes ao grupo <i>Babesia</i> sensu stricto.....	19
Figura 4 - Distribuição dos casos de babesia por espécie ao longo do continente europeu.....	20
Figura 5 - Distribuição geográfica de casos de <i>B. gibsoni</i> pelo mundo.....	21

Capítulo 2

Figura 1- Representação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 18S rRNA.....	39
Figura 2 - <i>Babesia gibsoni</i> (forma de anel) em interior de hemácias visualizadas em esfregaço sanguíneo de cão doméstico (1.000 x).....	44
Figura 3 - Árvore filogenética por máxima-verossimilhança da ordem Piroplasmida com base no gene 18S rRNA (n=91 - ~1.100 pb).....	46
Figura 4 - Árvore filogenética por máxima-verossimilhança do grupo <i>Babesia</i> sensu stricto com base no gene 18S rRNA (n=26 - ~1.700 pb).....	46
Figura 5 - Rede de haplótipos (n=261 - ~400 pb) de isolados de <i>B. gibsoni</i> com base no gene 18S rRNA e na sua distribuição geográfica por país.....	48
Figura 6 - Rede de haplótipos (n=74 - ~600 pb) de isolados de <i>B. gibsoni</i> com base no gene <i>cytb</i> e na sua distribuição geográfica por país.....	50
Figura 7 - Rede de haplótipos (n=36 - ~500 pb) de isolados de <i>B. gibsoni</i> com base no gene <i>cox3</i> e na sua distribuição geográfica por país.....	52
Figura 8 - Rede de haplótipos (n=12 - ~600 pb) de isolados de <i>B. gibsoni</i> com base no gene <i>hsp70</i> e na sua distribuição geográfica por país.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs.....	41
Tabela 2 - Valores hematológicos e de bioquímica sérica mensurados ao longo do curso da doença no animal infectado por <i>B. gibsoni</i>	43
Tabela 3 - Valores de identidade obtidos por BLASTn para os marcadores 18S rRNA, <i>cox3</i> , <i>cytb</i> e <i>hsp70</i>	45
Tabela 4 - Índices de diversidade genética com base nos genes 18S rRNA, <i>cox3</i> , <i>cytb</i> e <i>hsp70</i> para isolados de <i>B. gibsoni</i>	48
Tabela 5 - Relação dos haplótipos com base no gene 18S rRNA e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.....	49
Tabela 6 - Relação dos haplótipos com base no gene <i>cytb</i> e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.....	51
Tabela 7 - Relação dos haplótipos com base no gene <i>cox3</i> e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.....	53
Tabela 8 - Relação dos haplótipos com base no gene <i>hsp70</i> e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.....	54



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.0 INTRODUÇÃO

A babesiose canina é uma importante doença infecciosa na clínica médica veterinária. Possui distribuição mundial, além de ampla ocorrência pelo território brasileiro. É uma doença que possui como agentes etiológicos protozoários do gênero *Babesia* que podem ser divididos quanto à sua morfologia em grandes e pequenas babesias (OLIVEIRA et al., 2023).

Apesar de diversas espécies de piroplasmídeos já terem sido relatadas em cães, sete espécies de *Babesia* têm maior importância clínico-epidemiológica e podem ser divididas em dois grupos: as grandes babesias *Babesia canis*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli* e *Babesia* sp. coco e as pequenas babesias *Babesia conradae*, *Babesia vulpes* e *Babesia gibsoni*. As espécies se diferem quanto à sensibilidade diagnóstica, assim como nos protocolos terapêuticos utilizados e no prognóstico (KARASOVÁ et al., 2022).

A transmissão da *Babesia* ocorre principalmente pela picada do carrapato, hospedeiro definitivo, que transfere a forma infectante, o esporozoíto, para o animal. Merece destacar-se que a participação no ciclo epidemiológico de uma espécie de carrapato está intimamente relacionada à espécie de babesia envolvida. No Brasil, em que *B. vogeli* é o piroplasmídeo comumente encontrado em cães, tem-se como hospedeiro definitivo o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2023).

No animal infectado, o parasito passa pelo processo de merogonia, que leva à formação de merozoítos intraeritrocitários, podendo ocasionar o aparecimento de sinais clínicos que variam de leves a graves nos cães (JALOVECKA et al., 2019). O tratamento e o prognóstico da babesiose canina são variáveis e dependem das condições de saúde do animal, do nível de parasitemia e da espécie de *Babesia* envolvida (SOLANO-GALLEG0 et al., 2016). Esse cenário demanda uma correta identificação da espécie infectante nos casos diagnosticados, embora, na prática da clínica médica veterinária brasileira, isso não seja comumente realizado.

O diagnóstico pode ser realizado por meio da identificação do parasito em esfregaço sanguíneo, sendo uma técnica de baixa sensibilidade. A sensibilidade é ainda mais reduzida considerando a ocorrência de pequenas babesias, que são difíceis de serem observadas mesmo em casos de parasitemia elevada. Embora a especificidade seja alta, a visualização do merozoíto intraeritrocitário não permite distinguir a espécie envolvida. Por outro lado, a PCR é a técnica molecular com maior acurácia, possuindo alta sensibilidade e especificidade. Além disso, pode permitir a identificação da espécie envolvida (KARASOVÁ et al., 2022).

Nesse cenário, *B. gibsoni* é uma babesia que merece atenção. Endêmica na Ásia, tem sido considerada nos últimos anos um agente emergente, especialmente na Europa (GUO et al.,

2020; SCHNITTGER et al., 2022; TEODOROWSKI et al., 2022). Esta espécie de babesia geralmente causa um quadro clínico mais severo do que *B. vogeli*, com prognóstico reservado a desfavorável em muitos casos. O uso do tratamento convencional para grandes babesias com dipropionato de imidocarb é considerado ineficaz e não é recomendado. Por isso, outros protocolos foram desenvolvidos tais como o uso de atovaquona e azitromicina. Adicionalmente, a cura parasitológica dificilmente é atingida, mesmo com o emprego de um protocolo terapêutico adequado, diferentemente do que é observado para as grandes babesias. Isso faz com que o animal possa apresentar após o tratamento alterações clínico-patológicas e, mesmo aqueles que não apresentam mais sinais clínicos, podem vir a adoecer sob condições de estresse (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

No Brasil, existem dois relatos publicados sobre a ocorrência de *B. gibsoni* com dados moleculares, ambos na região sul. Contudo, carecem de caracterização molecular adequada, com nenhuma sequência nucleotídica depositada. Da mesma forma, os autores não apresentaram dados morfológicos do agente (JOJIMA et al., 2008; TRAPP et al., 2006). Logo, faz-se necessário investigar efetivamente a presença desse parasito em outras regiões do Brasil, assim como caracterizar molecularmente os possíveis isolados brasileiros dada a sua importância clínica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar e descrever a presença de *B. gibsoni* no Brasil com caracterização molecular e dados morfológicos de um isolado do Distrito Federal.

1.2 Objetivos Específicos

- Descrever os achados clínico-patológicos e o histórico clínico do animal infectado por *B. gibsoni*;
- Apresentar dados morfológicos do isolado encontrado por meio de avaliação de esfregaço sanguíneo;
- Caracterizar molecularmente o isolado encontrado por meio de análises filogenéticas e de diversidade genética utilizando genes nucleares (18S rRNA e *hsp70*) e mitocondriais (*cytb* e *cox3*).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Taxonomia e Filogenia Molecular

A primeira descrição de agentes do gênero *Babesia* ocorreu em 1888, quando o patologista Victor Babes identificou micro-organismos em sangue periférico de vacas na Romênia. Na situação, ele nomeou os agentes como *Haematococcus bovis*, achando tratar-se de bactérias (PENZHORN, 2020). Somente em 1893, seu aluno Starcovici caracterizou os isolados como protozoários e sugeriu o gênero *Babesia* em homenagem ao seu professor. Contudo, ao longo dos anos, outros termos foram utilizados para nomear outros agentes pertencentes ao mesmo gênero, e apenas em 1918 o termo “*Babesia*” começou a ser devidamente utilizado (PENZHORN, 2020). Em 1893, *Pyrosoma bigeminum* foi descrito como responsável pela “Febre do Texas” (SMITH & KILBOURNE, 1893). Em 1895, dada a sua similaridade morfológica, protozoários descritos em cães na Itália foram descritos como *Pyrosoma bigeminum* var. *canis*. Contudo, o gênero *Pyrosoma* foi logo substituído por *Piroplasma* considerando que o primeiro termo já estava em uso antes de 1893. Em 1918, percebeu-se que o gênero *Babesia* seria a denominação taxonômica correta, que passou a ser utilizado desde então (PENZHORN, 2020).

O gênero *Babesia* pertence ao reino Protozoa, filo Apicomplexa, à ordem Piroplasmida e à família Babesiidae. O filo Apicomplexa é formado por protozoários que possuem uma estrutura celular particular que dá o nome ao grupo, o complexo apical. Formado por diferentes organelas, essa estrutura promove a entrada dos parasitos nas células hospedeiras. Taxonomicamente, o filo pode ser dividido em dois subfilos, Sporozoa e Apicomonada. Sporozoa é o grupo em que se encontram os parasitos de interesse veterinário, enquanto Apicomonada incluem espécies de vida livre (MUÑOZ-GÓMEZ et al., 2019).

Dentro dos esporozoários, existe a classe Hematozoa, que inclui os piroplasmídeos e hemosporídeos. *Babesia* spp. juntamente com *Theileria* spp. e *Cytauxzoon* spp. constituem a ordem Piroplasmida. Historicamente, a divisão entre a família Theileriidae e Babesiidae se baseou na capacidade desses parasitos infectarem somente hemácias (*Babesia*) ou macrófagos e/ou linfócitos adicionalmente (*Theileria* e *Cytauxzoon*). Contudo, dados moleculares têm modificado esse entendimento (SCHNITTGER et al., 2022). Diversas árvores filogenéticas da ordem Piroplasmida já foram descritas, destacando-se as de Schreeg et al. (2016) utilizando o gene rRNA 18S mais genoma mitocondrial, Jalovecka et al. (2019) com o uso do gene rRNA

Figura 1. Árvore filogenética por máxima verossimilhança da ordem Piroplasmida com base no gene 18S rRNA (adaptado de DUARTE et al., 2024)

Os isolados de *Babesia* podem infectar mamíferos ou aves a depender da espécie do agente. Nesse cenário, cada um dos principais clados monofiléticos da ordem Piroplasmida possui um grupo de hospedeiros limitado, pertencendo à mesma ordem, classe ou família. Um exemplo é o grupo Percei, que infecta somente aves. Isso sugere um processo de coespeciação entre parasito e hospedeiro (SCHNITTGER et al., 2022). Uma exceção são os grupos Western (clado III) e *Babesia* sensu stricto (clado X), que infectam uma variedade de espécies de hospedeiros de diferentes famílias (JALOVECKA et al., 2019). Outra característica que se associa a esse contexto é o tamanho do genoma desses agentes. Eles são muito menores quando comparados com outros do filo Apicomplexa, como *Toxoplasma* spp., que possui genoma significativamente maior e que infecta uma ampla variedade de espécies. Portanto, esse fenômeno provavelmente deve-se ao nicho ecológico reduzido dos piroplasmídeos, associando-se desse modo com o número limitado de hospedeiros que infectam (LIU, Q. et al., 2023).

Existem oito espécies de maior relevância clínico-epidemiológica de piroplasmídeos que acometem cães, que incluem as grandes babesias, com 3-5 µm de diâmetro (*B. vogeli*, *B. canis*, *B. rossi* e *Babesia* sp. coco), e pequenas babesias, com 1-3 µm (*B. vulpes*, *B. conradae*, *B. gibsoni*) (Figura 2). *Babesia negevi*, descrita em Israel, é tida como uma babesia de tamanho intermediário não se encaixando em nenhum dos dois grupos acima. *Rangelia vitalli* seria a outra espécie, com ocorrência restrita na América do Sul. Contudo, mais recentemente foi sugerido uma revisão taxonômica do grupo baseado em dados moleculares utilizando o gene 18S rRNA (SCHNITTGER et al., 2022). Nesse cenário, é proposto que *R. vitalli* seja incluído no grupo *Babesia* sensu stricto. Apesar de *R. vitalli* apresentar esquizontes, considera-se mais provável que tal característica possa ser uma autapomorfia do grupo *Babesia* sensu stricto, e que a capacidade de infectar somente hemácias, sendo uma simplesiomorfia, não deveria ser critério para classificação de um grupo taxonômico (SCHNITTGER et al., 2022).

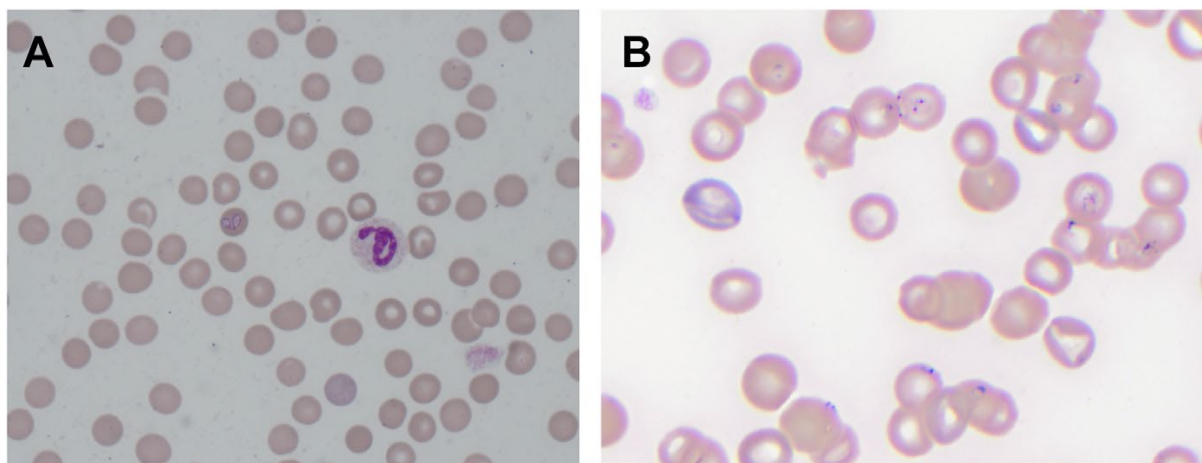


Figura 2. Presença de *Babesia vogeli*, uma grande babesia (A), e de *Babesia conradae*, uma pequena babesia, em esfregaço sanguíneo (adaptado de DEAR; BIRKENHEUER, 2022).

Por sua vez e com base em dados moleculares, *Babesia gibsoni* está incluída no grupo *Babesia sensu stricto* (clado X), assim como *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi*. Em contrapartida, as outras pequenas babesias se encontram em clados separados: *B. vulpes* no grupo *Babesia microti-like* (clado I) e *B. conradae* no grupo Western (clado III) (JALOVECKA et al., 2019).

B. gibsoni foi descrita pela primeira vez por Patton (1910) com a observação de agentes menores que *B. canis* em esfregaço sanguíneo, tendo inicialmente nomeado o agente como *Piroplasma gibsoni*. A descrição foi feita a partir de amostras coletadas de cães e chacais na Índia. Por muito tempo, até final do século XX e início do século XXI, as grandes babesias visualizadas em esfregaço sanguíneo de cães eram consideradas *B. canis* (l.s) e as pequenas babesias como *B. gibsoni* (l.s) (PENZHORN, 2020). Apesar de evidências como hospedeiros e vetores distintos e diferentes regiões geográficas de ocorrência apontarem para uma diversidade maior de espécies ou subespécies nesses grupos, somente em 1989 foi proposta a existência de três subespécies dentro de *B. canis* (l.s): *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi* (UILENBERG et al., 1989). Atualmente, aceita-se que cada um desses agentes corresponda a uma espécie distinta (*B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi*) (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). Para *B. gibsoni* (l.s), apenas em 2000, foram apresentados dados moleculares suportando a existência de três espécies distintas. Até então, os isolados eram classificados apenas como genótipos distintos de uma única espécie, podendo ser o genótipo “Ásia”, “Espanha” ou “Califórnia” (KJEMTRUP et al., 2006; ZAHLER; GOTHE, 2000). Porém, foi em 2006 que os isolados “Califórnia” foram descritos como uma nova espécie: *B. conradae*, em homenagem à pesquisadora Patricia Ann Conrad, pela sua contribuição na área (KJEMTRUP et al., 2006).

Somente em 2019, *B. gibsoni* isolado “Espanha”, também denominado anteriormente como *Babesia (Theileria) anne* ou *Babesia microti*-like, foi descrita como uma nova espécie, *B. vulpes* (BANETH et al., 2019).

2.2 Ciclo Biológico

B. gibsoni é um parasito heteroxênico, dependendo de um hospedeiro definitivo e um intermediário para a seu desenvolvimento. O hospedeiro definitivo é o carrapato, uma vez que a reprodução sexuada ocorre nesses artrópodes. Os hospedeiros intermediários são canídeos, nos quais ocorre o ciclo assexuado (JALOVECKA et al., 2019).

Inicialmente, o carrapato inocula por meio da picada a forma infectante do agente, o esporozoíto, em seu hospedeiro. Para ocorrer a transmissão, é necessário que o artrópode esteja fixado na pele do animal por 48 a 72h (KARASOVÁ et al., 2022). Na circulação sanguínea, os esporozoítos invadem as hemácias e se diferenciam em trofozoítos. Pelo processo de merogonia, são gerados merozoítos, que se multiplicam por fissão binária no interior dessas células, provocando sua lise e a liberação de mais parasitos. Alguns deles se diferenciam em gametócitos enquanto outros infectam novas hemácias. Após o carrapato ingerir esses gametócitos, diferenciam-se em gametas conhecidos como corpos raiados no epitélio intestinal. Os corpos raiados se fundem formando um zigoto que penetra as células intestinais, onde por um processo meiótico, são gerados os cinetos primários. Essas células haploides infectam diferentes tecidos do carrapato. Um deles, é o tecido ovariano, o que justifica a capacidade de transmissão transovariana dessa espécie. Transmissão transtadial também ocorre. Nas glândulas salivares, os cinetos secundários se multiplicam formando um esporoblasto, e posteriormente passarão pelo processo de esporogonia, dando origem aos esporozoítos, que são as formas infectantes (Figura 3) (JALOVECKA et al., 2019).

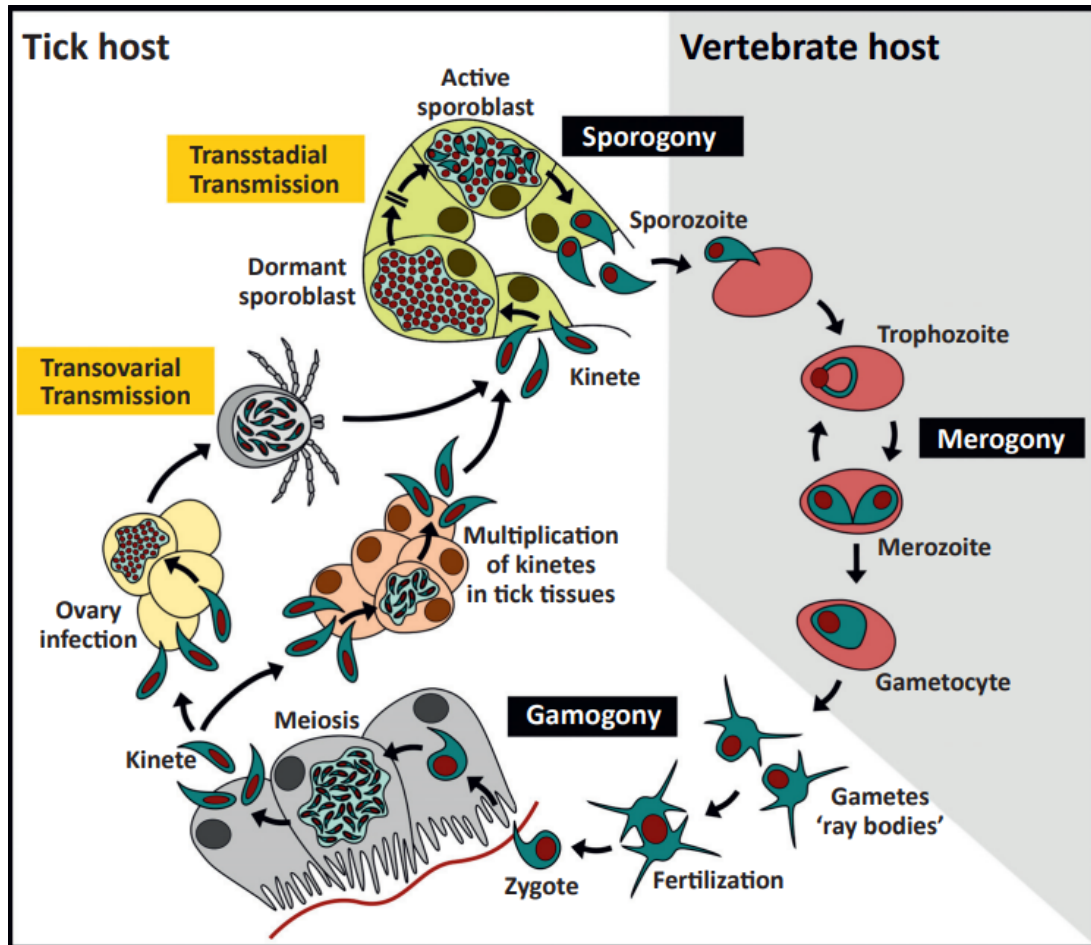


Figura 3. Ciclo biológico das babesias pertencentes ao grupo *Babesia sensu stricto* (adaptado de JALOVECKA et al., 2019).

Os quatro vetores envolvidos ou com provável participação na transmissão de *B. gibsoni* são os carrapatos *Haemaphysalis bispinosa*, com ocorrência na Ásia, *Haemaphysalis longicornis*, na Ásia, na Oceania e nos Estados Unidos, *Haemaphysalis hystricis*, na Ásia, e *Rhipicephalus sanguineus*, com ampla distribuição mundial (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). A participação de *R. sanguineus* na transmissão de *B. gibsoni* na Europa e nos Estados Unidos não está comprovada, apesar da ocorrência desse vetor nessas regiões (DEAR; BIRKENHEUER, 2022; KARASOVÁ et al., 2022). No Brasil, apenas *R. sanguineus* tem sua ocorrência descrita. Interessantemente, considerando a distribuição geográfica de *B. gibsoni* pelo continente europeu, percebe-se a existência de casos em que *R. sanguineus* comumente não ocorre, enquanto os casos de *B. vogeli* acompanham a área de distribuição dessa espécie de carrapato. Isso aponta para a possibilidade de outra forma de transmissão, que não a vetorial, entre esses animais (Figura 4) (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

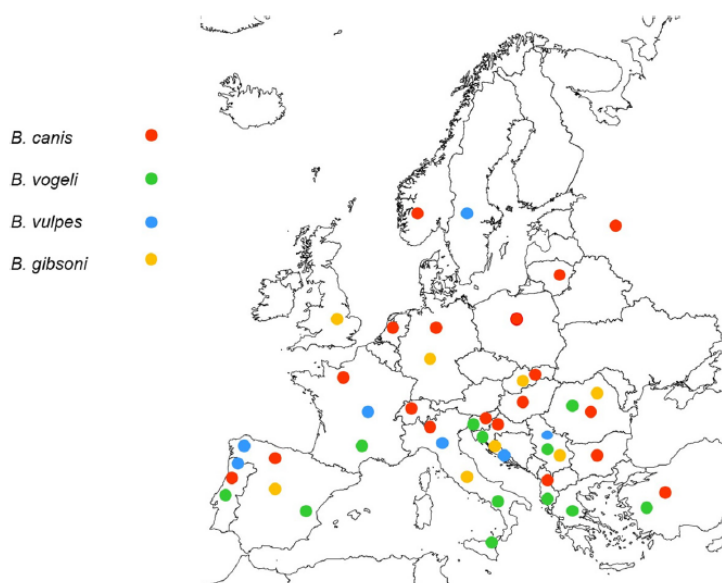


Figura 4. Distribuição dos casos de babesia por espécie ao longo do continente europeu (adaptado de SOLANO-GALLEGO et al., 2016)

As formas de transmissão, diferentemente das grandes babesias, envolvem não só a transmissão por carrapatos, mas também a transmissão direta por meio de feridas ocasionadas por mordidas. Esse modo de transmissão é observado em especial nas raças American Pit Bull Terrier e American Staffordshire Terrier, comumente envolvidas em brigas de cães (KARASOVÁ et al., 2022). Na realidade, supõe-se que esse modo de transmissão tenha relevante importância epidemiológica em certos países, em especial na Europa, nos Estados Unidos e na Austrália, onde essas raças são a maioria ou uma parcela importante dos casos (BIRKENHEUER et al., 2005; JEFFERIES et al., 2007; KARASOVÁ et al., 2022). Nos Estados Unidos, um laboratório veterinário relatou que 75% dos cães com *B. gibsoni* eram da raça American Pit Bull Terrier (BIRKENHEUER et al., 2018). No Japão, também se observa uma alta prevalência em cães associados a esse tipo de atividade (MATSUU et al., 2004). Os quatro cães relatados por Trapp et al. (2006) no Brasil não se enquadravam nessas raças. Outros modos de transmissão direta incluem transmissão transuterina, confirmada experimentalmente (FUKUMOTO et al., 2005), e por transfusão sanguínea (STEGEMAN et al., 2003).

2.3 Epidemiologia

A distribuição geográfica de *B. gibsoni* é ampla, com ocorrência na Ásia, na Oceania, na Europa, na África, na América do Norte, na América Central e na América do Sul (LIU, M.

et al. 2022) (Figura 5). É tipicamente um agente endêmico em vários países da Ásia, assim como nos Estados Unidos (BIRKENHEUER et al., 2022). Na Europa, tem sido considerado um possível agente emergente, com ocorrência em dez países, embora o número de casos seja baixo em muitos desses países (KARASOVA et al., 2022). A prevalência do agente pode variar conforme a região.

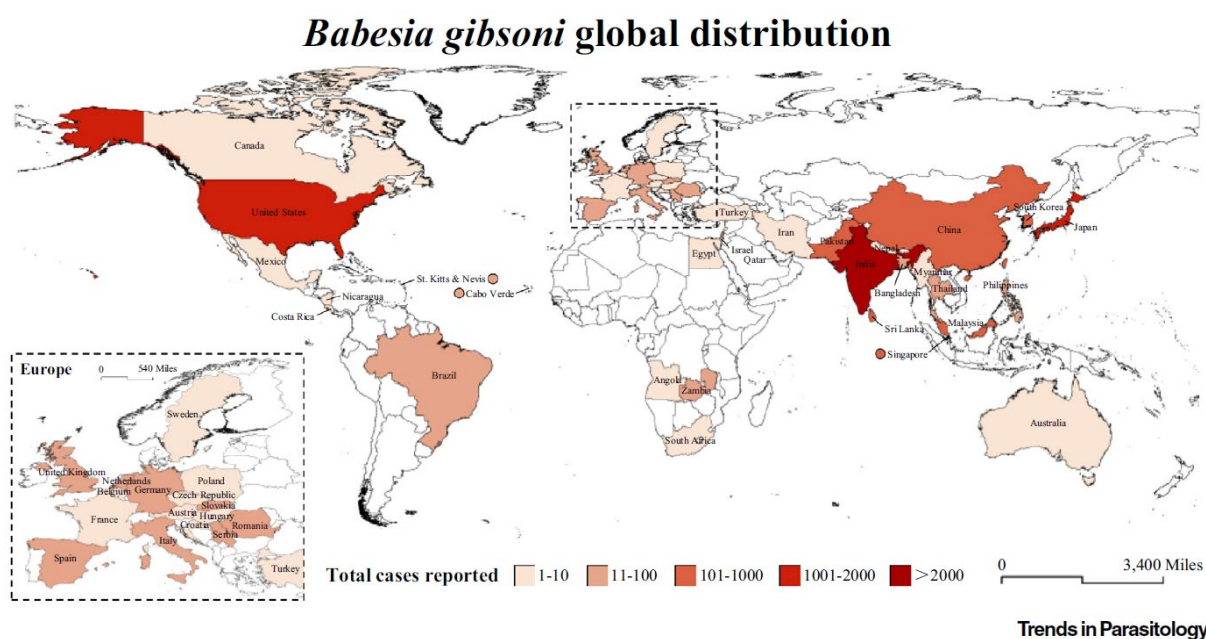


Figura 5. Distribuição geográfica de casos de *B. gibsoni* pelo mundo (adaptado de LIU, M. et al., 2022).

Babesia gibsoni é o principal ou um dos principais agentes da babesiose canina na Ásia, com destaque para China, Japão, Malásia, Sri Lanka, Índia e Taiwan (KARASOVÁ et al., 2022). Na China, *B. gibsoni* é a babesia de maior ocorrência em cães. Nesse país, a ocorrência varia de baixos valores, como 4,7%, a altos, como 64,2%, quando utilizada a PCR como ferramenta diagnóstica (GUO et al., 2020). Em Taiwan, foi relatada um soroprevalência de 15,7% para *B. gibsoni* (SU et al., 2023). Na Índia, há descrição de prevalência de 0,2% (ABD RANI et al., 2011) a 47,3% (JAIN et al., 2017) a depender da região. No Japão, a prevalência relatada foi cerca de 30,4% (MIYAMA et al., 2005).

Na Europa, o primeiro relato confirmado com dados moleculares de ocorrência de *B. gibsoni* foi em 2003, na Espanha (CRIADO-FORNELIO, 2003). Posteriormente, relatos pontuais na Alemanha e Itália foram descritos (HARTELT et al., 2007; TROTTA et al., 2009). Na Itália, descreveu-se soroprevalência de 0,2% para *B. gibsoni* quando testadas 1.311 amostras de sangue de cães. Nenhum deles foi positivo na qPCR (VENEZIANO et al., 2018).

Atualmente, o maior número de casos de *B. gibsoni* são provenientes dos países do Leste Europeu (TEODOROWSKI et al., 2022). Nessa região, Croácia e Romênia foram os primeiros países a relatarem a ocorrência desse agente. Na Croácia, foi realizado um estudo com 929 amostras testadas para *B. gibsoni*. Na ocasião, apenas 0,6% dos animais foram positivos na PCR, sendo todos assintomáticos (BECK et al., 2009). Já na Romênia, relatou-se a ocorrência de *B. gibsoni* em 28,6% de 49 amostras de sangue de cães com sinais clínicos típicos de babesiose. Nesse estudo, foi empregado PCR-RFLP para identificação do agente. Os animais eram provenientes da região leste e nordeste do país (IMRE et al., 2013). Em outra investigação na Romênia, apenas 1% dos animais de um total de 96 cães sintomáticos da região sul foram positivos para *B. gibsoni*. Esses dois estudos mostram como dentro de um mesmo país pode haver uma variação importante na ocorrência de *B. gibsoni* (ANDERSSON et al., 2017). Na Polônia, 1,4% dos cães foram positivos quando 216 amostras de sangue periférico foram testadas por PCR, enquanto na Sérvia foram 5,7% positivos de 158 cães (TEODOROWSKI et al., 2022).

Nos Estados Unidos, alguns relatos de pequenas babesias já eram descritos na década de 90, porém somente em 2000 esclareceu-se quais isolados eram de fato *B. gibsoni* e quais deveriam ser classificados como uma espécie distinta (KJEMTRUP et al., 2006; ZAHLER; GOTHE, 2000). Nos Estados Unidos, *B. gibsoni* é a principal babesia em cães (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). Um estudo relatou que 79% das amostras de um laboratório comercial dos Estados Unidos positivas para *Babesia* eram *B. gibsoni* (BIRKENHEUER et al., 2018). Na América Central, somente três países descreveram a presença desse agente (PANTI-MAY; RODRÍGUEZ-VIVAS, 2020). Nessa região, São Cristovão e Neves foi o primeiro país a relatar a ocorrência de *B. gibsoni*, com 10% de positivos de um total de 372 cães aparentemente saudáveis (KELLY et al., 2013). Na Nicarágua, 10% de um total de 39 cães (WEI et al., 2014b), enquanto na Costa Rica foram 5% de 40 cães (WEI et al., 2014a). Em todos os estudos foi utilizado qPCR ou qPCR mais sequenciamento para identificação.

Na América do Sul, existem apenas dois relatos de *B. gibsoni*, ambos no Brasil. O primeiro deles foi em 2006, quando quatro de um total de dezesseis cães no Paraná foram positivos para *B. gibsoni*. Contudo, somente 424 pb do gene 18S rRNA foram obtidos no sequenciamento, apresentando 100% de identidade com o isolado *B. gibsoni* Asia 1(AF175300). Não está claro também no trabalho se os quatro isolados foram de fato sequenciados uma vez que nenhuma sequência se encontra depositada no GenBank (TRAPP et al., 2006). Em 2008, também no Paraná, foi relatado que 13,8% de 282 cães foram positivos para *B. gibsoni*. Porém, a técnica utilizada para determinação da espécie foi PCR-RFLP, e o

padrão de digestão enzimática foi determinado com base em apenas duas sequências depositadas, uma de *B. vogeli* do Brasil, e outra de *B. gibsoni* da Espanha. Nesse estudo, não foi realizado sequenciamento de nenhum isolado (JOJIMA et al., 2008). Além disso, utilizando oligonucleotídeos genéricos para piroplasmídeo, PIRO F e PIRO R, Jojima et al. (2008) admitiram que as sequências eram pertencentes ao gênero *Babesia*. Nos dois estudos, foram visualizadas estruturas sugestivas de piroplasmídeo em esfregaço sanguíneo, porém nenhum dado morfológico foi apresentado. Logo, não há ainda uma descrição bem caracterizada e consistente da ocorrência de *B. gibsoni* no Brasil. Além disso, existem relatos mais antigos sem dados moleculares que já apontavam para ocorrência de pequenos piroplasmídeos no Brasil por meio da observação em esfregaço sanguíneo (BRACCINI et al., 1992) e por sorologia para *B. gibsoni* (GOTHE & WEGERTDT, 1991).

2.4 Patogenia e Sinais Clínicos

A patogenicidade de *B. gibsoni* é considerada como moderada a severa, sendo mais patogênica que *B. vogeli* (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). A gravidade da doença depende da idade do animal, do estado imunológico, da parasitemia e de infecções ou doenças concomitantes. Os casos mais graves ocorrem principalmente em filhotes e animais até dois anos. Após o quadro agudo, comumente o animal continua cronicamente infectado (KARASOVÁ et al., 2022). Dessa forma, os sinais clínicos são variáveis e o animal infectado pode apresentar desde uma infecção subclínica a sinais graves levando ao óbito (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

A anemia é um dos achados laboratoriais mais comumente encontrados nas infecções por *B. gibsoni* (GROVES; DENNIS, 1972). Ela se manifesta tipicamente como uma anemia hemolítica regenerativa por hemólise extra e intravascular, decorrentes de mecanismos imunomediados e não imunes. Esses mecanismos envolvem lise de eritrócitos por ação direta do parasito ao sair da célula, por aumento da fragilidade osmótica, por aumento do estresse oxidativo e por deposição de anticorpos e fatores do sistema complemento sobre hemácias (KARASOVÁ et al., 2022). Pode-se observar em esfregaço sanguíneo sinais de regeneração medular tais como anisocitose e policromasia, hemácias nucleadas e corpúsculos de Howell-Jolly (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Adicionalmente, quando ocorre anemia hemolítica imunomediada, podem ser visualizados outros achados como a presença de esferócitos, hemácias fantasmas e aglutinação positiva em solução salina (GARDEN et al., 2019). A trombocitopenia é outro achado tipicamente encontrado em cães infectados, podendo em alguns

casos ser a única alteração no hemograma. Sugere-se que ela ocorra por destruição imunomediada ou consumo. O leucograma por sua vez é variável, podendo ocorrer leucocitose ou leucopenia, assim como neutrofilia ou neutropenia (KARASOVÁ et al., 2022).

Outros achados laboratoriais podem incluir azotemia, proteinúria, elevação das enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), hemoglobinúria, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Em alguns casos pode haver aumento da lipase pancreática (BIRKENHEUER et al., 1999; BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2016; TROTTA et al., 2009). Grande parte dessas alterações se deve à resposta inflamatória sistêmica causada pelo agente, sendo um importante fator na patogenia da doença (TÓTHOVÁ et al., 2020). Foi demonstrado que nas infecções por *B. gibsoni* pode ocorrer uma liberação acentuada de citocinas inflamatórias que justificariam a severidade da doença e o acometimento de órgãos em que o parasito não se encontra diretamente (BROWN; SHIEL; IRWIN, 2015; TÓTHOVÁ et al., 2020).

Os sinais clínicos são inespecíficos e podem incluir fraqueza, apatia, anorexia, febre, mucosas pálidas, esplenomegalia, linfadenomegalia, petéquias, equimoses, diarreia, vômito e icterícia. Em casos mais severos, o animal pode desenvolver coagulopatias, insuficiência renal e até mesmo falha de múltiplos órgãos (KARASOVÁ et al., 2022; SOLANO-GALLEGO et al., 2016; TEODOROWSKI et al., 2022). Outros sinais menos comuns incluem alterações dermatológicas e neurológicas (GONDE et al., 2016; TASAKI et al., 2013). Cães com infecção crônica podem ser assintomáticos ou apresentar quadros intermitentes de febre, além de perda de peso e letargia (TÓTHOVÁ et al., 2020).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de *B. gibsoni* pode ser desafiador levando em consideração a morfologia do agente, a baixa parasitemia e a diversidade de piroplasmídeos em cães. Três métodos principais são utilizados para o diagnóstico: PCR, sorologia e visualização do agente em lâmina (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

A visualização de *B. gibsoni* pode ser realizada por meio da avaliação de esfregaço sanguíneo. Uma das vantagens desse método é o custo reduzido e o tempo relativamente rápido de realização do exame. Contudo, apresenta baixa sensibilidade, exigindo níveis consideráveis de parasitemia, geralmente encontrados na fase aguda da doença, além de experiência por parte do patologista (KARASOVÁ et al., 2022). A detecção fica ainda mais difícil em casos de

infecção crônica. Mesmo em casos severos, a parasitemia pode ficar abaixo de 1% (DEAR; BIRKENHEUER, 2022).

O treinamento e a experiência do patologista são importantes considerando a pequena dimensão do parasito (1-3 μm). Junto a isso, se não devidamente corado, o citoplasma pode não se destacar, podendo ser confundido com outras estruturas, como corpúsculos de Howell-Jolly. Logo, os merozoítos e trofozoítos não são facilmente visualizados, levando a falsos-negativos (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Porém, não é possível pela avaliação morfológica determinar a espécie e até mesmo o gênero do piroplasmídeo visualizado em lâmina, sendo necessário o diagnóstico molecular para elucidação (DEAR; BIRKENHEUER, 2022).

O diagnóstico molecular é o mais adequado para identificação do agente, possuindo alta sensibilidade e especificidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Protocolos de PCR em tempo real espécie-específicos foram desenvolvidos, permitindo a identificação de *B. gibsoni* em uma única reação (PANICKER et al., 2024). Os marcadores geralmente utilizados nos testes moleculares incluem o gene 18S rRNA e as regiões ITS1 e ITS2. Porém, destaca-se possibilidade de utilização de marcadores mitocondriais (*cytb*, *cox1*, *cox3*) que, por apresentarem um maior número de cópias por célula quando comparada com os marcadores nucleares, podem aumentar a sensibilidade do teste (QUROLLO et al., 2017). É possível também a utilização de oligonucleotídeos mais genéricos, ou para o grupo dos piroplasmídeos, ou para o gênero *Babesia*, para então posteriormente se realizar o sequenciamento e caracterização molecular dos isolados (PANTI-MAY; RODRÍGUEZ-VIVAS, 2020; QUROLLO et al., 2017). Além disso, é importante levar em consideração o período pré-patente que pode durar entre sete e onze dias (KARASOVÁ et al., 2022). Recomenda-se o uso da PCR também para o acompanhamento após 60 e 90 dias do início do tratamento para avaliar se houve remissão (DEAR; BIRKENHEUER, 2022).

Métodos sorológicos, especificamente ELISA, RIFI e testes imunocromatográficos, estão disponíveis, sendo úteis quando não há parasitemia ou quando ela está abaixo do limite de detecção da PCR, especialmente nos quadros de infecção crônica (KARASOVÁ et al., 2022). Além disso, falsos-negativos são prováveis nos testes sorológicos se realizados na fase aguda da doença, quando a soroconversão pode ainda não ter ocorrido. Logo, é interessante que se repita a sorologia após 4-8 semanas. Contudo, reações cruzadas com outras espécies de *Babesia* podem ocorrer, o que faz que a especificidade seja moderada para muitos desses testes (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

2.6 Tratamento e Profilaxia

O tratamento se diferencia daquele utilizado para as grandes babesias. Ele busca a melhora clínica do paciente, podendo reduzir a parasitemia a níveis indetectáveis pela PCR, porém somente alguns animais obtêm cura parasitológica. O paciente pode persistir com alterações laboratoriais como anemia e trombocitopenia, mesmo na ausência de sinais clínicos. Além disso, o animal pode vir a adoecer novamente sob condições de estresse (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). Existem alguns protocolos terapêuticos possíveis. Entre eles o mais preconizado é o uso de atovaquona (13,5 mg/kg, a cada 8h) com azitromicina (10 mg/kg, a cada 24h) por 10 dias (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2004). A atovaquona é um fármaco antiprotozoário e atua sobre o citocromo b, interferindo no metabolismo mitocondrial do parasito. Porém, alguns isolados podem possuir a mutação M128I ou M128V, que confere resistência a esse fármaco. Essas mutações não sinônimas ocorrem no provável sítio de ligação da proteína mitocondrial com o fármaco. Na Ásia, a prevalência dessas mutações pode chegar a 47%, como observado em Taiwan, enquanto nos Estados Unidos relatou-se 3,5% (BIRKENHEUER et al., 2018). A azitromicina é um antibiótico pertencente a classe dos macrolídeos, e atua em bactérias ligando-se a subunidade 50S ribossomal e consequentemente bloqueando o processo de tradução de mRNA. Acredita-se que ele interfira de maneira semelhante na subunidade 50S do apicoplasto desses parasitos (KARASOVÁ et al., 2022).

Na impossibilidade da utilização do primeiro protocolo ou ineficácia, pode-se realizar, buscando a melhora clínica, a administração em conjunto de clindamicina (25 mg/kg, a cada 12h), metronidazol (15 mg/kg, a cada 12h) e doxiciclina (5 mg/kg, a cada 12h) (DEAR; BIRKENHEUER, 2022; SUZUKI et al., 2007), ou o uso de doxiciclina (7–10 mg/kg, a cada 12h) com enrofloxacin (2–2.5 mg/kg, a cada 12h) e metronidazol (5–10 mg/kg, a cada 12h) por 6 semanas (LIN; HUANG, 2010). Contudo, o uso desses antibióticos dificilmente leva à cura parasitológica (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). O uso de acetato de diminazeno é proibido em alguns países devido aos seus efeitos tóxicos. Os efeitos de toxicidade sobre o organismo podem afetar rins e fígado. Porém, a depender da região, pode ser utilizado no tratamento para *B. gibsoni* em doses mais baixas (KARASOVÁ et al., 2022). Da mesma forma, o tratamento busca a remissão dos sinais clínicos. A utilização de dipropionato de imidocarb, comumente empregado no tratamento de *B. vogeli* e *B. canis*, não é recomendada para pequenas babesias, dada a sua baixa eficácia nesses casos (KARASOVÁ et al., 2022).

Diferentemente das grandes babesias, as medidas de profilaxia baseadas somente no controle de vetores por meio de produtos carrapaticidas podem não ser eficazes, considerando

outras formas de transmissão importantes, especificamente por via transuterina e por feridas ocasionadas por mordidas (BIRKENHEUER et al., 2018). Não há vacinas comerciais disponíveis que confirmem proteção contra *B. gibsoni* (KARASOVÁ et al., 2022)

3.0 Referências bibliográficas

ABD RANI, P. A. M. et al. A survey of canine tick-borne diseases in India. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 141, dez. 2011.

ANDERSSON, M. O. et al. Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 155, dez. 2017.

BANETH, G. et al. Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 129, dez. 2019.

BECK, R. et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 7, p. 843–848, jun. 2009.

BHOORA, R. et al. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 112–120, fev. 2009.

BIRKENHEUER, A. et al. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 2, p. 125–128, 1 mar. 1999.

BIRKENHEUER, A. J. et al. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000–2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 6, p. 942–947, 1 set. 2005.

BIRKENHEUER, A. J. et al. *Babesia gibsoni* cytochrome b mutations in canine blood samples submitted to a US veterinary diagnostic laboratory. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1965–1969, nov. 2018.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. 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 of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, set. 2003.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Efficacy of Combined Atovaquone and Azithromycin for Therapy of Chronic *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) Infections in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2004.

BRACCINI, G. et al. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de Protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986 a 1990. **Arq Fac Vet UFRGS**, v. 20, p. 134–149, 1992

BROWN, A. L.; SHIEL, R. E.; IRWIN, P. J. Clinical, haematological, cytokine and acute phase protein changes during experimental *Babesia gibsoni* infection of beagle puppies. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 185–196, out. 2015.

CRIADO-FORNELIO, A. Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 1–2, p. 123–129, 3 nov. 2003.

DEAR, J. D.; BIRKENHEUER, A. Babesia in North America. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1193–1209, nov. 2022.

DISCH, J. et al. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. 2003.

DUARTE, M. A. et al. *Cytauxzoon brasiliensis* sp. nov. (Apicomplexa: Theileriidae), a new species infecting a little-spotted-cat (*Leopardus tigrinus*) (Carnivora: Felidae) from Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 101, n. 5, p. 53, out. 2024.

FUKUMOTO, S. et al. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1031–1035, ago. 2005.

GARDEN, O. A. et al. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 313–334, mar. 2019.

GONDE, S. et al. A unique case of *Babesia gibsoni* infected dog with paraplegia. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 4, p. 1605–1608, dez. 2016.

GOTHE, R.; WEGERDT, S. Die Babesiosen des Hundes in Deutschland: epidemiologische Fallanalysen. p. 170–173, 1991.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L. *Babesia gibsoni*: Field and laboratory studies of canine infections. **Experimental Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 153–159, fev. 1972.

GUO, W.-P. et al. Molecular detection and genetic characteristics of *Babesia gibsoni* in dogs in Shaanxi Province, China. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 366, dez. 2020.

HARTELT, K. et al. First Evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in Dogs in Western Europe. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 163–166, jun. 2007.

IMRE, M. et al. Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: Occurrence of *Babesia gibsoni* associated with breed. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 500–502, dez. 2013.

- IKEDA, P. et al. First molecular detection of piroplasmids in non-hematophagous bats from Brazil, with evidence of putative novel species. **Parasitology Research**, v. 120, n. 1, p. 301–310, jan. 2021.
- JAIN, K. J. et al. High prevalence of small *Babesia* species in canines of Kerala, South India. **Veterinary World**, v. 10, n. 11, p. 1319–1323, nov. 2017.
- JALOVECKA, M. et al. *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 5, p. 356–368, maio 2019.
- JEFFERIES, R. et al. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 11, p. 459–463, nov. 2007.
- JOJIMA, F. S. et al. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, supl. 1, p. 277–283, 2008.
- KARASOVÁ, M. et al. The Etiology, Incidence, Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment of Canine Babesiosis Caused by *Babesia gibsoni* Infection. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 739, 16 mar. 2022.
- KELLY, P. J. et al. Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53450, 15 jan. 2013.
- KJEMTRUP, A. M. et al. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p. 103–111, maio 2006.
- KRAWCZAK, F. da S. et al. Phylogenetic Inferences Based on Distinct Molecular Markers Confirm a Novel *Babesia* Species (*Babesia goianiaensis* nov. sp.) in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and Associated Ticks. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 2022, 2023.
- LIN, M.-Y.; HUANG, H.-P. Use of a doxycycline-enrofloxacin-metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. **Acta Vet Scand**, v. 52, n. 1, p. 27, 2010.
- LIU, Q. et al. *Babesia gibsoni* Whole-Genome Sequencing, Assembling, Annotation, and Comparative Analysis. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 4, p. e00721-23, 17 ago. 2023.
- LIU, M.; IGARASHI, I.; XUAN, X. *Babesia gibsoni*: a review on its biology, epidemiology, and control strategies. Elsevier, 2022.
- MATSUU, A. et al. Incidence of Canine *Babesia gibsoni* Infection and Subclinical Infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 8, p. 893–897, 2004.

MIYAMA, T. et al. Epidemiological Survey of *Babesia gibsoni* Infection in Dogs in Eastern Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 5, p. 467–471, 2005.

MONGRUEL, A. C. B. et al. *Theileria terrestris* nov. sp.: A Novel *Theileria* in Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*) from Two Different Biomes in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2319, 2022.

MUÑOZ-GÓMEZ, S. A. et al. *Nephromyces* represents a diverse and novel lineage of the Apicomplexa that has retained apicoplasts. **Genome Biology and Evolution**, p. evz155, 22 jul. 2019.

OLIVEIRA, Á. F. X. D. et al. Molecular detection of hemoplasmas in rescued black-eared opossums (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826) from southeastern Brazil, with evidence of a novel genotype infecting marsupials. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 2, 2023.

PANICKER, V. P. et al. Standardization of quantitative PCR (qPCR) method to detect the level of parasitaemia in *Babesia gibsoni* infected dogs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 224, p. 107009, set. 2024.

PANTI-MAY, J. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100417, jul. 2020.

PENZHORN, B. L. Don't let sleeping dogs lie: unravelling the identity and taxonomy of *Babesia canis*, *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 184, dez. 2020.

QUROLLO, B. A. et al. Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 128, dez. 2017.

SCHNITTGER, L. et al. The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. **Parasitology Research**, v. 121, n. 5, p. 1207–1245, 2022.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry, 1893. v. 1-5. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/216226>. Acesso em: 28 de dezembro de 2024.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 336, dez. 2016.

STEGEMAN, J. R. et al. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 7, p. 959–963, 1 abr. 2003.

- SU, B.-L. et al. Correlation between *Babesia* Species Affecting Dogs in Taiwan and the Local Distribution of the Vector Ticks. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 3, p. 227, 16 mar. 2023.
- SUZUKI, K. et al. A Possible Treatment Strategy and Clinical Factors to Estimate the Treatment Response in *Babesia gibsoni* Infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 5, p. 563–568, 2007.
- TASAKI, Y. et al. Generalized Alopecia with Vasculitis-Like Changes in a Dog with Babesiosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 10, p. 1367–1369, 2013.
- TEODOROWSKI, O. et al. *Babesia gibsoni* Infection in Dogs—A European Perspective. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 730, 14 mar. 2022.
- TÓTHOVÁ, C. et al. Differences in serum protein electrophoretic pattern in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni* and *Babesia canis*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18904, 3 nov. 2020a.
- TRAPP, S. M. et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1–2, p. 177–180, out. 2006.
- TROTTA, M. et al. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3–4, p. 318–322, nov. 2009.
- UILENBERG, G. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, v. 11, n. 1, p. 33–40, jan. 1989.
- VENEZIANO, V. et al. Distribution and risk factors associated with *Babesia* spp. infection in hunting dogs from Southern Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1459–1463, set. 2018.
- WEI, L. et al. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs on Costa Rica. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 1, 1 jan. 2014a.
- WEI, L. et al. First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 126, dez. 2014b.
- ZAHLER, M.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, n.7, p.544-548, 2000.



CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Babesia gibsoni* EM CÃO NO DISTRITO FEDERAL

BRASÍLIA

2025

RESUMO

A babesiose canina é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia*, hemoparasitas importantes na clínica veterinária de cães. *Babesia vogeli* é a espécie predominante no Brasil. Contudo, *Babesia gibsoni*, comumente encontrada na Ásia e nos Estados Unidos, tem sido reportada como um agente emergente e possui características distintas quanto ao diagnóstico, tratamento, profilaxia e prognóstico. No presente estudo, é relatado o primeiro caso de *B. gibsoni* no Brasil confirmado por dados clínico-laboratoriais, moleculares e morfológicos. Um cão da raça Dachshund no Distrito Federal apresentou sinais inespecíficos, incluindo febre, desidratação e anemia persistente. A infecção para piroplasmídeo foi confirmada por PCR para o gene 18S rRNA e posteriormente o agente foi caracterizado com o uso de quatro marcadores moleculares (*cytb*, *cox3*, *hsp70* e 18S rRNA). Análises filogenéticas e de identidade confirmaram a espécie do isolado como *B. gibsoni*. Redes de haplótipos foram construídas e índices de diversidade calculados. Eles apontaram para uma diversidade genética importante dentro da espécie. O isolado brasileiro se agrupou no haplótipo dominante para o gene 18S rRNA. A mesma rede revela uma possível expansão populacional recente do agente. Os genes *cytb* e *cox3* demonstraram ser marcadores com alta variabilidade genética, sendo adequados para análises de diversidade intraespecífica. Os achados observados sugerem a possibilidade de que infecções por *B. gibsoni* possam estar sendo subdiagnosticadas no Brasil. O protocolo terapêutico utilizado no presente estudo, baseado em dipropionato de imidocarb e azitromicina, não foi eficaz na eliminação do parasita, corroborando a necessidade de abordagens de tratamento distintas daquelas utilizadas para *B. vogeli*. Além disso, com base na diversidade genética e distribuição global desse agente, sugere-se que estudos epidemiológicos, filogenéticos e filogeográficos sejam realizados para compreender a distribuição e impacto desse agente no país. Este estudo reforça a importância da vigilância molecular na babesiose canina e destaca *B. gibsoni*, um patógeno emergente, como um diagnóstico diferencial a ser considerado na clínica de cães no Brasil.

Palavras-chave: *Canis lupus familiaris*, Rede de haplótipos, PCR, Filogenia molecular

ABSTRACT

Canine babesiosis is a disease caused by protozoa of the genus *Babesia*, an important hemoparasite in veterinary clinical practice. *Babesia vogeli* is the predominant species in Brazil. However, *Babesia gibsoni*, commonly found in Asia and the United States, has been reported as an emerging pathogen with distinct characteristics regarding diagnosis, treatment, prophylaxis, and prognosis. In the present study, we report the first confirmed case of *B. gibsoni* in Brazil, based on clinical, laboratory, molecular, and morphological data. A Dachshund dog from the Federal District presented with nonspecific clinical signs, including fever, dehydration, and persistent anemia. *Babesia* infection was confirmed by PCR targeting the 18S rRNA gene, and the agent was further characterized using four molecular markers (*cytb*, *cox3*, *hsp70*, and 18S rRNA). Phylogenetic and sequence identity analyses confirmed the species as *B. gibsoni*. Haplotype networks were constructed, and diversity indices were calculated, revealing significant genetic variability within the species. The Brazilian isolate clustered within the dominant haplotype for the 18S rRNA gene. The same network suggests a possible recent population expansion of the pathogen. The *cytb* and *cox3* genes exhibited high genetic variability, demonstrating their suitability as markers for intraspecific diversity analyses. The findings suggest that *B. gibsoni* infections may be underdiagnosed in Brazil. The therapeutic protocol employed in this study, based on imidocarb dipropionate and azithromycin, was ineffective in eliminating the parasite, reinforcing the need for treatment strategies distinct from those used for *B. vogeli*. Furthermore, given the genetic diversity and global distribution of this pathogen, epidemiological, phylogenetic, and phylogeographic studies are warranted to better understand its occurrence and impact in the country. This study underscores the importance of molecular surveillance in canine babesiosis and highlights *B. gibsoni*, an emerging pathogen, as a differential diagnosis in the clinical assessment of dogs in Brazil.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, Haplotype network, PCR, Molecular phylogeny

1.0 INTRODUÇÃO

A babesiose canina é uma enfermidade transmitida principalmente por carrapatos e afeta cães em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil. O agente causador pertence ao gênero *Babesia*, grupo formado por protozoários hemoparasitas, cada qual com implicações clínicas e epidemiológicas específicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). O ciclo do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado envolve a invasão de hemácias, e sua replicação no interior dessas células (JALOVECKA et al., 2019). Os sinais clínicos são variáveis, dependendo da espécie do parasito, do nível de parasitemia, do estado imunológico, e da idade do animal (KARASOVÁ et al., 2022).

No Brasil, a espécie *Babesia vogeli* é a mais prevalente, sendo transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto e *Rhipicephalus linnaei* (DANTAS-TORRES et al., 2021). Por outro lado, *Babesia gibsoni*, endêmica na Ásia e nos Estados Unidos, tem ganhado atenção como agente emergente em novas regiões, especialmente devido à gravidade dos quadros clínicos ocasionados e à dificuldade de eliminação do parasito, mesmo com tratamentos adequados (DEAR; BIRKENHEUER, 2022; GUO et al., 2020; KARASOVÁ et al., 2022). Além disso, o protocolo terapêutico empregado se difere do utilizado para *B. vogeli* e a profilaxia baseada somente em produtos carrapaticidas pode não ser suficiente (DEAR; BIRKENHEUER, 2022).

O diagnóstico é muitas vezes desafiador. Esses parasitos se enquadram no grupo das pequenas babesias (1-3 μ m), sendo difícil sua visualização em esfregaço sanguíneo (KARASOVÁ et al., 2022). Além disso, não é possível determinar a espécie somente pela morfologia em lâmina. A PCR por sua vez é a ferramenta diagnóstica mais adequada por possuir maior sensibilidade e permitir a correta caracterização do agente (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). A sorologia também pode ser útil, especialmente em infecções crônicas, nas quais pode não haver parasitemia detectável por PCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Embora existam dois relatos pontuais de *B. gibsoni* em cães no Brasil, ambos da região sul do país, os dados disponíveis não incluem uma caracterização molecular detalhada bem como não incluem dados morfológicos para uma descrição mais consistente desse agente no território nacional (JOJIMA et al., 2008; TRAPP et al., 2006). Estudos comprovando a ocorrência desse agente e sua diversidade genética são essenciais para compreender sua distribuição e impacto clínico, contribuindo para estratégias mais eficazes de diagnóstico e controle da doença.

Logo, deve-se investigar se infecções por *B. gibsoni* são um diagnóstico diferencial a ser considerado na clínica de cães no Brasil. É um agente com distribuição global e que provoca doença clínica importante com particularidades diagnósticas e terapêuticas (KARASOVÁ et al., 2022). Esse trabalho teve como objetivo, portanto, demonstrar pela primeira vez a ocorrência desse agente no Brasil apresentando dados clínico-laboratoriais, morfológicos e moleculares.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra Biológica

Um animal de uma região rural de Brasília foi atendido em um Hospital Veterinário particular em março de 2022. O animal era um cão da raça Dachshund, fêmea, de 16 anos, castrado. Era domiciliado e vivia em uma chácara na qual a tutora abrigava cães de resgate. Estava com a vacinação (antirrábica e polivalente) e desverminação em dia. A tutora não relatou viagem recente do animal nem a presença de carrapatos. O paciente apresentava mucosa pálidas, febre (38,5 °C) e desidratação, além de sensibilidade abdominal ao toque. Amostras de sangue foram coletadas em tubos secos ou com gel separador e com EDTA e encaminhadas ao Laboratório Veterinário Citopet e ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília entre março e setembro de 2022.

2.2 Análises

2.2.1. Avaliação Hematológica

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no laboratório veterinário Citopet. A determinação dos parâmetros dos hemogramas foi feita a partir das amostras de sangue com EDTA com o uso do contador automático MEK-6550 Nihon Kohden – Celltac. A leitura do esfregaço sanguíneo por microscopia ótica foi realizada para obtenção do diferencial leucocitário, avaliação da morfologia celular, pesquisa de hematozoários, e estimativa da concentração plaquetária. As lâminas de esfregaço sanguíneo foram coradas pelo método de Rosenfeld. As amostras para realização dos bioquímicos foram coletadas em tubo seco ou com gel separador e centrifugados a 4.000 rpm por 5 min para obtenção do soro. Os bioquímicos ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), creatinina e ureia foram feitos com o

uso dos reagentes da Labtest ® nos analisadores Labmax Plenno (Labtest ®) e ChemWell (Labtest ®).

2.2.2 Ensaios Moleculares

A extração de DNA, as cPCRs e as purificações para sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília. Para os ensaios moleculares foi coletado sangue total em tubos com EDTA. Para a extração de DNA, utilizou-se o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, EUA) de acordo com a instrução do fabricante. O DNA eluído foi armazenado a -20°C.

Uma PCR inicial foi feita para verificar a integridade do DNA e a presença de inibidores na amostra, utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R para amplificação de sequência parcial do gene *gapdh* de mamíferos (aproximadamente 400 pb) (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003). A reação de PCR foi realizada para um volume final de 25µL utilizando 2,0µL de DNA, solução tampão a 1X, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo, 1U de TaqDNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA). Água Milli-Q® purificada foi utilizada para completar o volume final da reação. A amplificação por PCR empregou desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação (1 min a 95°C), anelamento (1 min a 53°C), e extensão (1 min a 72°C), com um ciclo extensão final por 5 min a 72°C.

Uma PCR específica para *Babesia* e *Theileria* foi realizada com o intuito de confirmar a infecção por piroplasmídeo. Foi empregado o par de oligonucleotídeos BT-F1 e BT-R1 conforme Jefferies et al. (2007), amplificando um fragmento de aproximadamente 800 pb do gene 18S rRNA. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,0 µL de DNA, tampão de reação a 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA). Água ultrapura Milli-Q® foi utilizada para completar o volume final. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 45 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (20 seg a 58°C) e extensão (30 seg a 72°C), com extensão final por 7 minutos a 72°C.

Para a caracterização molecular, foram realizadas quatro PCRs conforme Bhoora et al. (2009). A primeira reação foi feita com os oligonucleotídeos NBabesia1F (modificado) e 18SRev-TB, produzindo um fragmento de aproximadamente 1.600 pb. O oligonucleotídeo NBabesia1F foi modificado para incluir a diversidade genética de *B. gibsoni*. Posteriormente,

o produto amplificado dessa PCR foi submetido a três *nested* PCRs. O oligonucleotídeo NBabesia1F foi modificado para englobar a diversidade genética de *B. gibsoni* para a região de anelamento. Sequências de *B. gibsoni* foram obtidas do banco de dados GenBank e alinhadas com o algoritmo ClustalW. A primeira *nested* PCR utilizou os oligonucleotídeos NBabesia1F (modificado) e BT18S3R, gerando um fragmento com cerca de 800 pb da região 5' do gene. A segunda reação utilizou os oligonucleotídeos BT18S3F e 18SRev-TB, que amplificou aproximadamente 800 pb da região 3'. A terceira reação amplificou uma região interna com cerca de 800 pb com os oligonucleotídeos BT18S2F e BT18S2R (Figura 1). Os produtos das *nested* PCRs foram sequenciados com a finalidade de se obter um fragmento quase completo do gene 18S rRNA, conforme Bhoora et al. (2009).

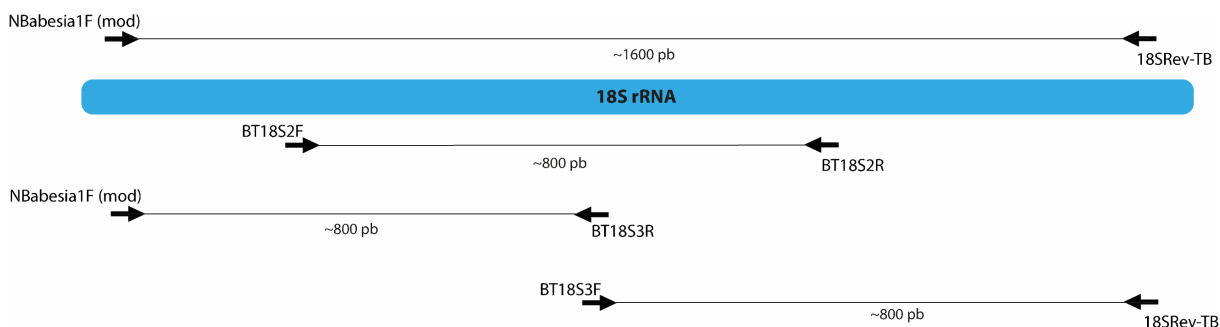


Figura 1. Representação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 18S rRNA.

A reação de PCR com os oligonucleotídeos NBabesia1F (modificado) e 18SRev-TB foi realizada, contendo 2,0 μ L de DNA, tampão de reação a 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), em um volume final de 25 μ L. Água ultrapura Milli-Q® foi utilizada para completar o volume final. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (1 min a 50°C) e extensão (1 min a 72°C), com extensão final por 7 minutos a 72°C (BHOORA et al., 2009).

A amplificação por PCR com os oligonucleotídeos NBabesia1F (modificado) e BT18S3R foi feita em um volume final de 25 μ L. A reação continha 2,0 μ L de DNA, tampão de reação a 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA) com a adição de água Milli-Q® ultrapura para atingir o volume final. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa

inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (1 min a 59°C) e extensão (1 min a 72°C), com extensão final por 5 minutos a 72°C (BHOORA et al., 2009).

As reações de PCR com os oligonucleotídeos BT18S3F e 18SRev-TB assim como BT18S2F e BT18S2R foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 2,0 µL de DNA, tampão de reação a 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA). Água ultrapura Milli-Q® foi utilizada para completar o volume final da reação. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (1 min a 55°C) e extensão (1 min 72°C), com extensão final por 5 minutos a 72°C (BHOORA et al., 2009).

Adicionalmente, foram realizadas PCRs para amplificação dos genes da proteína de choque térmico de 70 kD (*hsp70*), citocromo c oxidase 3 (*cox3*) e citococromo b (*cytb*). A reação para *hsp70* utilizou os oligonucleotídeos *hsp70* F1 e *hsp70* R1 de acordo com Soares et al. (2011), produzindo um fragmento de aproximadamente 700 pb. Para os genes *cox3* e *cytb*, as reações foram realizadas conforme Schreeg et al. (2016), gerando produtos com cerca de 600 e 1.000 pb, respectivamente.

Para avaliar a presença de parasitemia concomitante por outro agentes, também foram realizadas PCRs para *Leishmania* spp. (DISCH et al., 2003), *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. (PAROLA et al., 2000) e *Hepatozoon* spp. (INOKUMA et al., 2002). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão apresentadas na Tabela 1. Para todos os produtos de PCR, foi realizado eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídeo, com visualização em transiluminador UV (UVP LLC, Upland, 32 CA).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs.

Oligonucleotídeo	Gene Alvo	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Grupo Alvo	Referência
Gapdh-F / Gapdh-R	<i>gapdh</i> (~400 pb)	F: CCTTCATTGACCTCAACTACAT R: CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Mamífero	Birkenheuer et al. (2003)
BT-F1 / BT-R1	18S rRNA (~800 pb)	F: GGCTCATTACACAGTTATAG R: CCCAAGACTTTGATTTCTCTC	<i>Babesia/ Theileria</i>	Jefferies et al. (2007)
NBabesia1F (mod) / 18SRev-TB	18S rRNA (~1600 pb)	F: AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT R: GAATAATTCACCGATCACTCG	<i>Babesia/ Theileria</i>	Bhoora et al. (2009)
NBabesia1F (mod) / BT18S3R	18S rRNA (~800 pb)	F: AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT R: CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCC	<i>Babesia/ Theileria</i>	Bhoora et al. (2009)
BT18S3F / 18SRev-TB	18S rRNA (~800 pb)	F: GGGCATTCTGATTTAAGTATGACAGG R: GAATAATTCACCGATCACTCG	<i>Babesia/ Theileria</i>	Bhoora et al. (2009)
BT18S2F / BT18S2R	18S rRNA (~800 pb)	F: GGGTTCGATTCGGAGAGGG R: CCCGTGTGAGTAAATTAAGCCG	<i>Babesia/ Theileria</i>	Bhoora et al. (2009)
Cytb F1 / Cytb R1	<i>cytb</i> (~1200 pb)	F: TTAGTAAGGAACCTTGACAGGT R: CGGTAATCTTCTTATCTCTACG	Piroplasmida	Schreeg et al. (2016)
Cox3 F1 / Cox3 R1	<i>cox3</i> (~800 pb)	F: ACTGTCAGCTAAACGTATC R: ACAGGATTAGATACCTGG	Piroplasmida	Schreeg et al. (2016)
Hsp70 F1 / Hsp70 R1	<i>hsp70</i> (~700 pb)	F: CATGAAGCACTGGCCHTTCAA R: GCN CKG CTG ATG GTG GTG TTG TA	<i>Babesia/ Theileria</i>	Soares et al. (2011)
LFw / LBw	kDNA (~120 pb)	F: GGG TAGGGCGTTCTGCGAA R: CCGCCCTATTATACCAACCCC	<i>Leishmania</i>	Disch et al. (2003)
EHR16SD / EHR16SR	16S rRNA (~300 pb)	F: GGTACCYACAGAAGAAGTCC R: TAGCACTCATCGTTTACAGC	Anaplasmatidae	Parola et al. (2000)
HEPF / HEPR	18S rRNA (~700 pb)	F: ATACATGAGCAAAATCTCAAC R: CTTATTATCCATGCTGCAC	Hepatoozon	Inokuma et al. (2002)

Para o sequenciamento, os produtos das reações foram purificados utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification (Invitrogen®, Calsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA eluído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue, observando-se também a relação A260/280 e A260/230.

Os produtos purificados das PCRs foram sequenciados pelo método de Sanger no sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)) do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP, em Jaboticabal. A avaliação da qualidade das sequências e a trimagem foi realizada no programa Geneious v.9.0.5. As sequências foram submetidas à ferramenta BLASTn utilizando o banco de dados core_nt.

Foram realizadas duas árvores filogenéticas por máxima-verossimilhança com uso do programa RAxML v8.2. Com a finalidade de avaliar a posição desse isolado dentro da ordem Piroplasmida, a primeira árvore consistiu no uso de sequências parciais do gene 18S rRNA com pelo menos 800 pb, englobando os 14 clados bem estabelecidos de piroplasmídeos. A árvore foi construída com o modelo "Hasegawa, Kishino, and Yano" (HKY) com distribuição gama (G) e sítios invariantes (I) como matriz de substituição de acordo com o programa jModelTest v2.1.10. Foram utilizadas 91 sequências obtidas do banco de dados GenBank. O algoritmo

MUSCLE foi empregado e *Cardiosporidium cionae* (EU052685) foi colocado como grupo externo. A segunda árvore consistiu em analisar a posição do presente isolado dentro do grupo *Babesia* sensu stricto. Foram utilizadas 26 sequências de espécies pertencentes a esse grupo, incluindo sequências de *Babesia gibsoni*, obtidas do GenBank. O comprimento do alinhamento foi de aproximadamente 1.700 pares de bases e foi realizado com o algoritmo MUSCLE, incluindo *Cytauxzoon felis* como grupo externo. O modelo evolutivo HKY+G+I foi empregado como matriz de substituição de acordo com o programa jModelTest v2.1.10.

Para avaliar a diversidade intraespecífica, foram realizadas quatro redes de haplótipos com o auxílio do programa PopART v.1.7. Todas as sequências de cada marcador de *B. gibsoni* foram obtidas do banco de dados GenBank e foram incluídas nas análises quando possuíam tamanho adequado e correspondessem à mesma região nucleotídica. O método utilizado foi o TCS para a construção das redes. A primeira foi realizada com base em fragmento parcial do gene 18S rRNA e utilizou 260 sequências de *B. gibsoni*. O alinhamento possuía aproximadamente 400 pb. A segunda rede utilizou 74 sequências para o marcador *cytb*. O alinhamento possuía cerca de 600 pb. Para a terceira rede, utilizaram-se 36 sequências do marcador *cox3*, com alinhamento de aproximadamente 500 pb, enquanto para a quarta, foram 12 isolados com alinhamento de cerca de 600 pb. As redes foram construídas com base no país em qual cada isolado foi obtido.

Foi utilizado o programa DnaSP v. 6 para mensurar a diversidade de nucleotídeos (π), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (D_h), número médio de diferenças de nucleotídeos (K) e número de sítios segregantes (S) entre os isolados, para cada marcador.

3.0 RESULTADOS

3.1. Avaliação Clínica e Laboratorial

Foram analisadas laboratorialmente amostras de sangue de um canino da raça Dachshund, fêmea, de 16 anos, ao longo de 211 dias. A apresentação clínica consistia em mucosas pálidas, febre (38,5 °C) e desidratação, com sensibilidade abdominal ao toque. A queixa se iniciou em março de 2022, com melhoras e pioras da condição clínica e dos parâmetros hematológicos do animal de maneira intermitente, até o seu óbito em abril de 2023.

Ao longo do tratamento, o animal apresentou anemia persistente com hematócrito variando de 11% a 27%, número de hemácias de 1,3 a 3,43 ($\times 10^6$) e hemoglobina de 3,4 a 8,6 g/dL. A anemia era principalmente macrocítica hipocrômica, com visualização em esfregaço

sanguíneo de discretas a moderadas anisocitose e policromasia, além da presença de hemácias nucleadas e corpúsculos de Howell-Jolly. Apresentou flutuações na concentração de leucócitos chegando a ter uma reação leucemoide no dia 67 com a presença de neutrófilos tóxicos, desvio à esquerda regenerativo, neutrofilia e monocitose absolutas. As alterações mais frequentes no leucograma ao longo do tratamento foram neutrofilia e linfopenia absolutas, e desvio à esquerda regenerativo. Apresentou leucopenia apenas no dia 211. O animal também possuía trombocitopenia persistente durante o curso da doença, embora agregados plaquetários estivessem presentes na maioria das lâminas analisadas. A proteína plasmática total se manteve dentro do valor de referência durante todo o tempo. Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros laboratoriais do hemograma e dos bioquímicos do animal ao longo do curso da doença.

Tabela 2. Valores hematológicos e de bioquímica sérica mensurados ao longo do curso da doença no animal infectado por *B. gibsoni*.

	DIA 1	DIA 4	DIA 45	DIA 47	DIA 62	DIA 67	★ DIA 73	★ DIA 121	DIA 150	DIA 211	Valores de Referência
Hemácias (x10 ⁶)/uL	2,49	3,18	1,3	3,43	1,89	3,08	1,56	1,78	2,91	2,43	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	5,5	8,6	3,4	8,2	4,8	7,6	3,9	4,1	6,6	5,8	12 - 18
Hematócrito (%)	19	27	11	25	16	24	13	14	24	21	35 - 55
VCM (fL)	76	70	85	74	84	77	86	81	81	85	60 - 77
CHCM (g/dL)	29	32	31	32	30	32	29	28	28	28	31-36
Leucócitos (/uL)	6.100	15.900	15.600	16.800	12.200	17.400	52.500	35.900	17.400	5.100	6.000 - 18.000
Basófilos (/uL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200
Eosinófilos (/uL)	122	159	156	0	244	0	525	0	348	408	0 - 1.800
Bastonetes (/uL)	305	0	1.404	336	976	522	4.725	359	870	51	0-500
Segmentados (/uL)	5.185	14.787	12.480	15624	10.736	15.312	41.475	33.028	15.138	3.978	3.600 - 13.800
Linfócitos (/uL)	488	477	936	336	244	174	525	2.154	522	612	720 - 5.400
Monócitos (/uL)	0	477	624	504	0	1.392	5.250	359	522	51	0 - 1.800
Plaquetas (/uL)	46.000*	49.000*	101.000*	153.000	59.000*	105.000*	151.000	165.000*	132.000*	159.000*	180.000 - 500.000
Proteína plasmática total (g/dL)	7,2	6,0	7,2	6,2	6,4	6,4	7,2	7,0	6,8	7,8	5,8 - 8,2
ALT (U/L)	56	62	43	83	---	74	---	224	29	38	10 - 88
Fosfatase alcalina (U/L)	181	---	---	44	---	---	---	---	---	---	20 - 150
Ureia (mg/dL)	31	---	---	---	---	---	---	67	---	---	15 - 65
Creatinina (mg/dL)	0,6	0,6	0,5	0,4	---	0,6	---	0,6	1,0	0,9	0,5 - 1,5

Legenda: ALT – alanina aminotransferase. Estrela - dias em que foi observado o agente em lâmina.

Asterisco - presença de agregado plaquetário.

Os valores de bioquímicos não se mostraram alterados, à exceção da FA no dia 1 e da ALT no dia 121. Icterícia foi observada apenas ocasionalmente (Tabela 2). A suspeita do diagnóstico de infecção por piroplasmídeo ocorreu em maio de 2022, no dia 73, quando estruturas semelhantes a merozoítos/trofozoítos foram visualizadas em esfregaço sanguíneo. Tais estruturas se pareciam morfológicamente com pequenas babesias (1-3 µm), que

posteriormente foram identificadas como *B. gibsoni* (Figura 2). O animal foi testado para *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* por meio de teste ELISA, utilizando-se o teste rápido 4DX (IDEXX). O animal testou positivo para a presença de anticorpos contra *E. canis*.

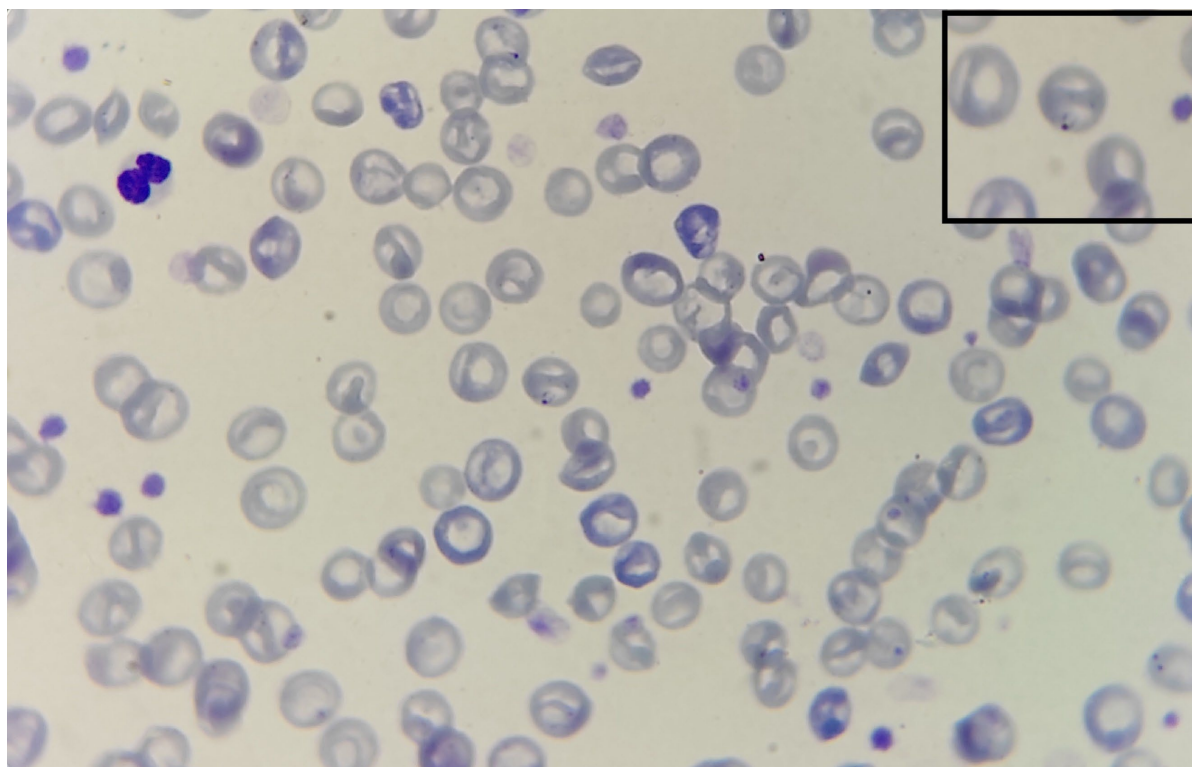


Figura 2. *Babesia gibsoni* (forma de anel) em interior de hemácias visualizadas em esfregaço sanguíneo de cão doméstico (1.000 x).

3.2. Ensaaios Moleculares por PCR

Para descartar parasitemia por outros agentes foi realizada cPCR para *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Hepatozoon* spp. Todas foram negativas nos testes realizados.

Para caracterização molecular, foram feitas quatro reações para diferentes regiões do gene 18S rRNA, de modo que se sobrepusessem e juntas formassem um consenso englobando quase todo o gene. Um fragmento final de 1.517 pb foi obtido. Para *cytb*, obteve-se o gene quase completo, com fragmento de 1.051 pb, enquanto para *cox3*, o gene completo, com 744 pb. Para *hsp70*, foi obtido um fragmento parcial de 617 pb.

3.3 Análises Filogenéticas e de Identidade

As sequências dos genes 18S rRNA, *cytb*, *cox3* e *hsp70* foram utilizadas nas análises de identidade por meio da ferramenta BLASTn. Todos os marcadores apresentaram alta identidade (98,81 -100%) com 100% de cobertura com isolados de *B. gibsoni* de diferentes países. O gene 18S rRNA apresentou 100% de identidade com o isolado norte-americano Smith Co Kennel 1 (DQ184507.1) obtido de cão doméstico. Os marcadores *cox3* e *hsp70* apresentaram 100% de identidade com um isolado do Japão e com o isolado TWN1 de Taiwan, respectivamente. A amostra de Taiwan foi obtida de um cão infectado, enquanto para o isolado do Japão não foram fornecidas informações acerca do hospedeiro. O marcador *cytb* apresentou 99,81% de identidade com a amostra HUVIMdr1 do Japão (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de identidade obtidos por BLASTn para os marcadores 18S rRNA, *cox3*, *cytb* e *hsp70*.

	Tamanho da Sequência	Identidade	Cobertura	E-value	Sequências com maior identidade	Países	Hospedeiros
18S rRNA	1.517 pb	100%	100%	0,0	<i>Babesia gibsoni</i> isolate Smith Co Kennel 1 (DQ184507.1)	EUA	<i>Canis lupus familiaris</i>
<i>cox3</i>	744 pb	100%	100%	0,0	<i>Babesia gibsoni</i> (AB499087.1)	Japão	----
<i>cytb</i>	1.051 pb	99,81%	100%	0,0	<i>Babesia gibsoni</i> cepa HUVIMdr1 (AB685183.1)	Japão	Cultivo celular
<i>hsp70</i>	617 pb	100%	100%	0,0	<i>Babesia gibsoni</i> cepa TWN1 (EF584826.1)	Taiwan	<i>Canis lupus familiaris</i>

A primeira árvore construída utilizou um alinhamento de cerca de 1.100pb do gene 18S rRNA, englobando os 14 clados monofiléticos bem estabelecidos da ordem Piroplasmida. Nela o isolado do presente estudo se agrupou dentro de *Babesia* sensu stricto, grupo que inclui *B. gibsoni* e as grandes babesias de cães (*B. vogeli*, *B. canis*, *B. rossi*). Todos os 14 clados apresentaram um bom suporte (Figura 3). Uma segunda árvore (~1.700 pb) utilizando somente sequências do grupo *Babesia* sensu stricto para o mesmo gene foi gerada, agrupando os isolados de *B. gibsoni* e o do presente estudo um clado monofilético bem suportado. As sequências dentro desse clado formaram politomias e eram provenientes da China, Japão e Estados Unidos. A identidade par a par desses isolados variou entre 97,8% e 99,9% (Figura 4).

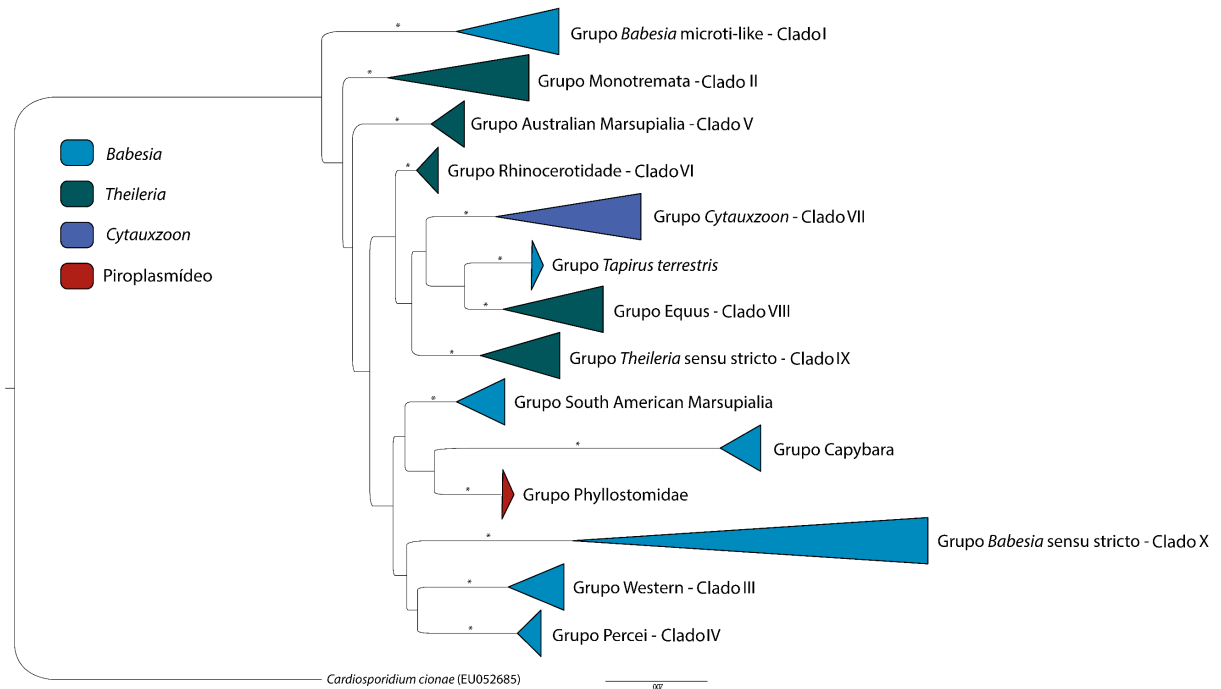


Figura 3. Árvore filogenética por máxima-verossimilhança da ordem Piroplasmida com base no gene 18S rRNA (n=91 - ~1.100 pb). O isolado do presente estudo está agrupado dentro de *Babesia sensu stricto*. *Cardiosporidium cionae* (EU052685) foi utilizado como grupo externo. Ramos com bom suporte (bootstrap >70%) estão destacados com asterisco.

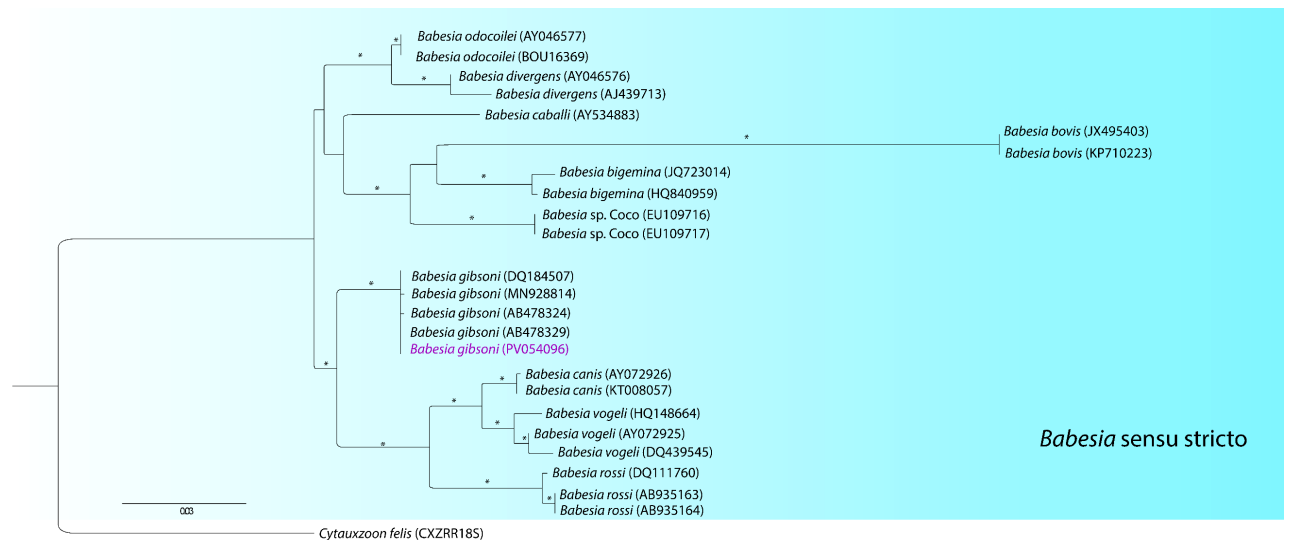


Figura 4. Árvore filogenética por máxima-verossimilhança do grupo *Babesia sensu stricto* com base no gene 18S rRNA (n=26 - ~1.700 pb). A sequência do presente estudo está em violeta (PV054096). *Cytauxzoon felis* foi utilizado como grupo externo. Ramos com bom suporte (bootstrap >70%) estão destacados com asterisco.

3.4. Redes de Haplótipos e Índices de Diversidade

Quatro redes de haplótipos foram construídas considerando as relações filogeográficas dos isolados. Para isso foram incluídas todas as sequências de *B. gibsoni* do banco de dados que possuísem tamanho adequado e correspondessem à mesma região nucleotídica. A primeira rede consistiu em 261 sequências parciais do gene 18S rRNA e incluiu 18 países distribuídos pela Ásia, Oceania, América do Norte, América Central, América do Sul e Europa (Figura 5). Foram obtidos 41 haplótipos (h), diversidade haplotípica (D_h) de 0,371, diversidade de nucleotídeos de 0,00406 (π), número médio de diferenças de nucleotídeos de 1,41 (K) e número de sítios segregantes (S) de 108 (Tabela 4). Utilizou-se um alinhamento de ~400 pb. A rede apresentou um padrão do tipo estrela, com um haplótipo central (H39) formado por 207 sequências provenientes de 15 países, incluindo a do presente estudo (PV054096). A maior parte dos haplótipos apresentou 1 ou 2 sequências. A maior parte das sequências recuperadas são da Índia (Figura 5). A relação entre os haplótipos e as sequências que os compõem se encontra na Tabela 5.

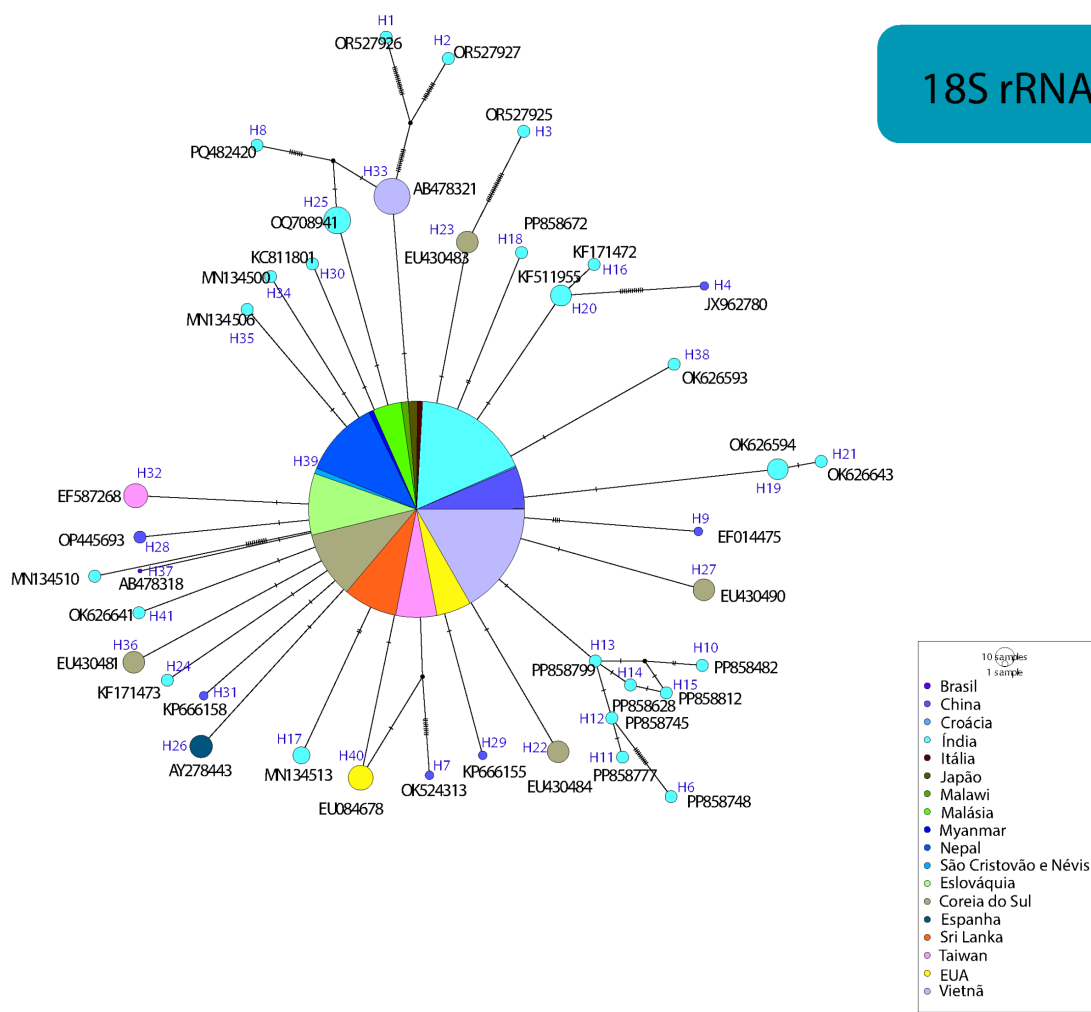


Figura 5. Rede de haplótipos (n=261 - ~400 pb) de isolados de *B. gibsoni* com base no gene 18S rRNA e na sua distribuição geográfica por país.

Tabela 4. Índices de diversidade genética com base nos genes 18S rRNA, *cox3*, *cytb* e *hsp70* para isolados de *B. gibsoni*.

	Diversidade de nucleotídeos (n)	Número de haplótipos (h)	Diversidade haplotípica (Dh)	Número médio de diferenças de nucleotídeos (K)	Número de sítios segregantes (S)	Número de sequências
18S rRNA	0,00406	41	0,371	1,410	108	260
<i>cox3</i>	0,01556	25	0,975	8,463	46	36
<i>cytb</i>	0,01306	32	0,949	8,057	44	74
<i>hsp70</i>	0,0111	7	0,833	6,848	25	12

Tabela 5. Relação dos haplótipos com base no gene 18S rRNA e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.

Haplótipo	Nº de Sequências	Sequências
Hap_1	1	OR527926
Hap_2	1	OR527927
Hap_3	1	OR527925
Hap_4	1	JX962780
Hap_5	1	MN134510
Hap_6	1	PP858748
Hap_7	1	OK524313
Hap_8	1	PQ482420
Hap_9	1	EF014475
Hap_10	1	PP858482
Hap_11	1	PP858777
Hap_12	1	PP858745
Hap_13	1	PP858799
Hap_14	1	PP858628
Hap_15	1	PP858812
Hap_16	1	KF171472
Hap_17	2	MN134513, MN134516
Hap_18	1	PP858672
Hap_19	3	OK626594, OK180506, OK626645
Hap_20	3	KF511955, KC954653, KF511956
Hap_21	1	OK626643
Hap_22	1	EU430484
Hap_23	1	EU430483
Hap_24	1	KF171473
Hap_25	5	OQ708941, OQ715344, OQ715345, KF606872, KC811802
Hap_26	1	AY278443
Hap_27	1	EU430490
Hap_28	2	OP445693, KP666156
Hap_29	1	KP666155
Hap_30	1	KC811801
Hap_31	1	KP666158
Hap_32	1	EF587268
Hap_33	3	AB478321, PP716414, PP716420
Hap_34	1	MN134500
Hap_35	1	MN134506
Hap_36	1	EU430481
Hap_37	2	AB478318, AB478327
Hap_38	1	OK626593
Hap_39	207	EU430492, KU500920, OR554230, OR554231, MG708223, OQ715343, OQ715346, OQ708940, OQ709154, OQ708944, OQ709155, OQ709156, OQ709157, KU500918, OQ835167, OQ857323, OQ835169, OQ857325, MN928825, MN928830, KP666166, DQ184507, KP666159, OK091621, PV054096, AF205636, JQ710685, AF175300, AB478328, AB118032, AB478319, AB478323, AB478324, AB478325, AB478329, AB478330, AF271081, AF396748, AF396749, FJ769386, FJ769387, FJ769388, KC811803, KP666157, KP666160, KP666160, KP666161, KP666162, KP666162, KP666164, KP666168, MN928814, MN928815, MN928820, MN928823, MN928816, MN928817, MN928818, MN928819, MN928824, MN928821, MN928822, MN928826, MN928827, MN928828, MN928829, MN928833, MN928831, MN928832, MT752609, MT752610, MW276038, OK091620, OP445695, OQ727056, OQ727057, AB478322, KP666163, KP666165, KF171470, LC012808, MW509822, MW509823, MW509824, MW509825, MW509826, MN093339, OK597187, OP445694, LC602469, AF175301, KC461261, KF171474, KF878944, LC830842, LC830843, LC830844, LC830845, LC830846, LC830847, LC830848, LC830849, LC830850, LC830851, LC830852, LC830853, LC830854, LC830855, LC830856, MN134499, MN134501, MN134502, MN134503, MN134504, MN134505, MN134508, MN134509, MN134511, MN134515, OP445691, OP445692, OP445696, OP445697, KF171471, KJ142323, MN134512, MN134514, MN134517, OQ396762, KF878947, KF112075, KF606868, KF606868, AB478320, AB478326, KF928958, MN134507, JX112784, OK175728, OR512917, MH718810, PP858490, EU430493, EF587269, EU430482, EU430485, EU430487, EU430489, EU430489, EU430491, EU430494, KF112074, KF606867, KF606869, KF606871, KF606873, KF606873, KF606874, MN080997, EU084679, EU430486, EU430488, KF606875, KU500916, MZ646030, PQ504910, KU500919, PP716410, PP716410, PP716411, PP716411, PP716412, PP716412, PP716413, PP716415, PP716416, PP716417, PP716418, PP716421, PP716422, PP716423, PP716424, KF606870, MZ293793, MW509821, OP781949, KU500917, FJ209023, OQ835173, OQ691967, OQ835165, OQ857321, OQ835175, OQ835171, OQ857327, LC012802, LC012802, KF606876, KU500921, KU500915, EU583386, OK626642, OK626644, KP666167, OQ716578, OQ716579
Hap_40	1	EU084678
Hap_41	1	OK626641

A segunda rede consistiu em 74 sequências parciais do gene *cytb*, incluindo 5 países, Japão, China, Brasil, Índia e Hungria, com alinhamento de ~600 pb (Figura 6). Foram obtidos 32 haplótipos (h), diversidade haplotípica (Dh) de 0,949, diversidade de nucleotídeos de 0,01306 (π), número médio de diferenças de nucleotídeos de 8,057 (K) e número de sítios segregantes (S) de 44 (Tabela 4). O isolado do presente estudo se agrupou no haplótipo H4, juntamente com a sequência japonesa MW816919. Esse foi o único haplótipo compartilhado por isolados de diferentes países dentro da rede. O maior haplótipo identificado foi o H1, com 11 sequências, enquanto a maioria apresentou 1 ou 2 sequências (Figura 6). A relação da composição de cada haplótipo se encontra na Tabela 6.

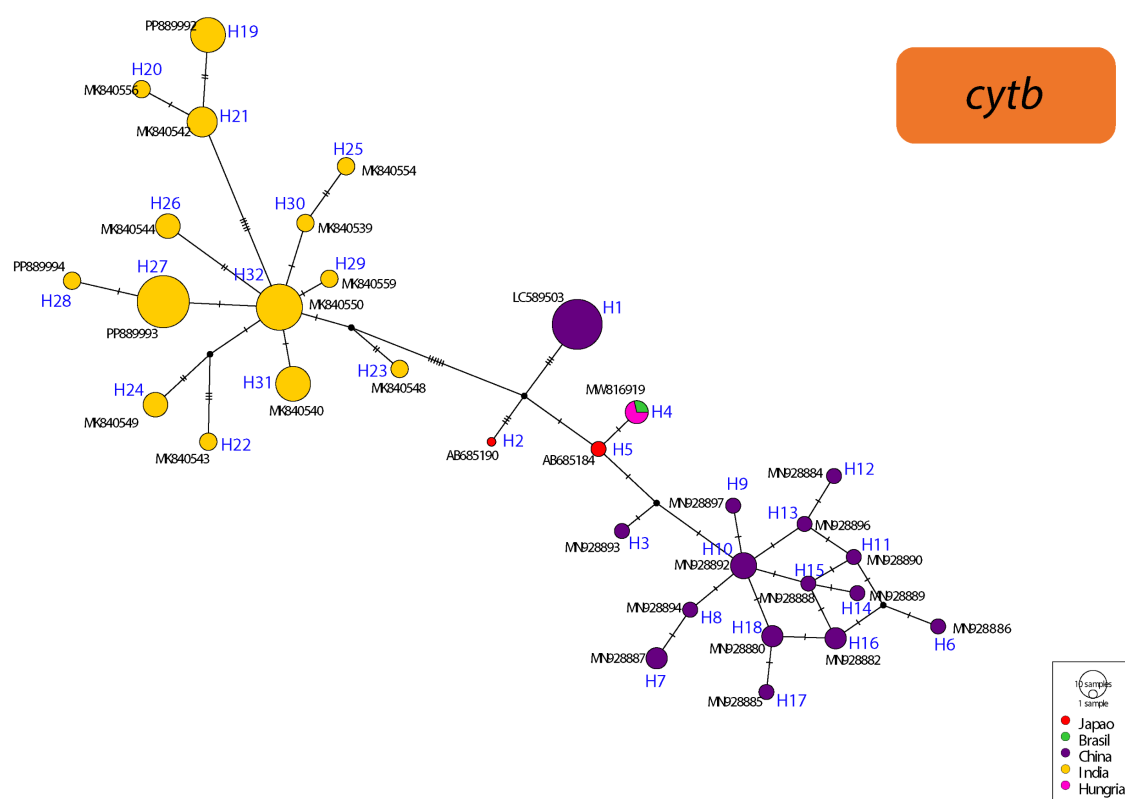


Figura 6. Rede de haplótipos (n=74 - ~600 pb) de isolados de *B. gibsoni* com base no gene *cytb* e na sua distribuição geográfica por país.

Tabela 6. Relação dos haplótipos com base no gene *cytb* e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.

Haplótipo	Nº de Sequências	Sequências
Hap_1	11	LC589503, LC589507, LC589510, LC589512, LC589504, LC589508, LC589505, LC589511, LC589506, LC589509, LC589513
Hap_2	1	AB685190
Hap_3	1	MN928893
Hap_4	2	MW816919, Isolado do presente estudo
Hap_5	3	AB685184, AB685187, JAVEPI010000007
Hap_6	1	MN928886
Hap_7	2	MN928887, MN928895
Hap_8	1	MN928894
Hap_9	1	MN928897
Hap_10	3	MN928892, KP666169, MN928891
Hap_11	1	MN928890
Hap_12	1	MN928884
Hap_13	1	MN928896
Hap_14	1	MN928889
Hap_15	1	MN928888
Hap_16	2	MN928882, MN928883
Hap_17	1	MN928885
Hap_18	2	MN928880, MN928881
Hap_19	4	PP889992, PP889999, PP890001, PP890002
Hap_20	1	MK840556
Hap_21	3	MK840542, MK840553, MK840558
Hap_22	1	MK840543
Hap_23	1	MK840548
Hap_24	2	MK840549, MK840560
Hap_25	1	MK840554
Hap_26	2	MK840544, MK840551
Hap_27	9	PP889993, PP889998, MK840538, PP889990, PP889991, PP889995, PP889996, PP889997, PP890000
Hap_28	1	PP889994
Hap_29	1	MK840559
Hap_30	1	MK840539
Hap_31	4	MK840540, MK840541, MK840545, MK840547
Hap_32	7	MK840550, MK840555, MK840546, OM933653, MK840552, MK840557, MK840561

A terceira rede foi construída com 36 sequências parciais do gene *cox3*, incluindo 4 países, Japão, China, Brasil e Índia, com alinhamento de ~500 pb (Figura 7). Foram obtidos 25

haplótipos (h), diversidade haplotípica (D_h) de 0,975, diversidade de nucleotídeos de 0,01556 (π), número médio de diferenças de nucleotídeos de 8,463 (K) e número de sítios segregantes (S) de 46 (Tabela 4). O isolado do presente estudo se agrupou no haplótipo H1. O maior haplótipo foi o H2, com 4 sequências. O número de sequências por haplótipo variou na maior parte entre 1 e 2. Nenhum haplótipo foi compartilhado por isolados de diferentes países (Figura 7). O número de acesso do GenBank das sequências de cada haplótipo se encontra na Tabela 7.

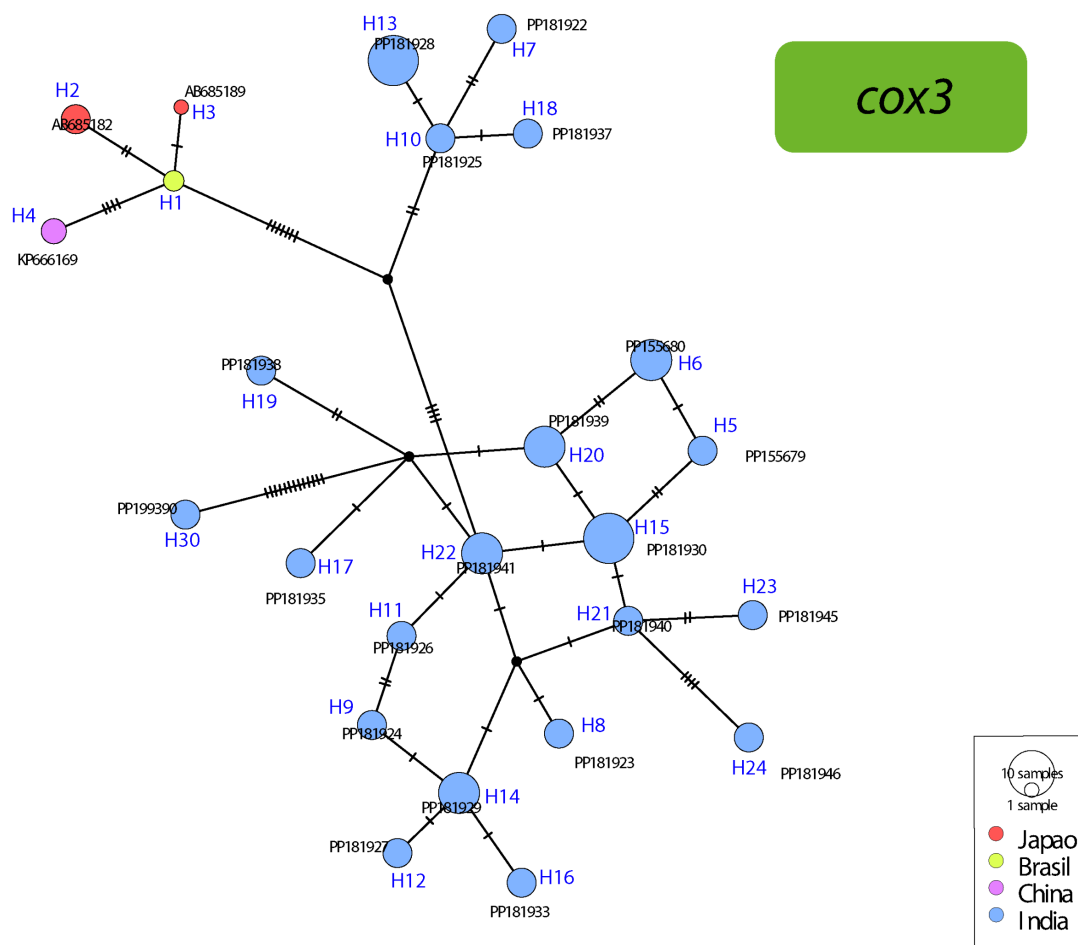


Figura 7. Rede de haplótipos (n=36 - ~500 pb) de isolados de *B. gibsoni* com base no gene *cox3* e na sua distribuição geográfica por país.

Tabela 7. Relação dos haplótipos com base no gene *cox3* e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.

Haplótipo	Nº de Sequências	Sequências
Hap_1	1	Isolado do presente estudo
Hap_2	4	AB685182, AB685183, AB685184, AB685186
Hap_3	1	AB685189
Hap_4	1	KP666169
Hap_5	1	PP155679
Hap_6	2	PP155680, PP155681
Hap_7	1	PP181922
Hap_8	1	PP181923
Hap_9	1	PP181924
Hap_10	1	PP181925
Hap_11	1	PP181926
Hap_12	1	PP181927
Hap_13	3	PP181928, PP181931, PP181932
Hap_14	2	PP181929, PP181934
Hap_15	3	PP181930, PP181936, PP181942
Hap_16	1	PP181933
Hap_17	1	PP181935
Hap_18	1	PP181937
Hap_19	1	PP181938
Hap_20	2	PP181939, PP181944
Hap_21	1	PP181940
Hap_22	2	PP181941, PP181943
Hap_23	1	PP181945
Hap_24	1	PP181946
Hap_25	1	PP199390

A quarta rede consistiu em 12 sequências parciais do gene *hsp70* com alinhamento de ~600 pb. Ela incluiu isolados de 4 países, Japão, Índia, Brasil e Taiwan. Foram obtidos 7 haplótipos (h), diversidade haplotípica (Dh) de 0,833, diversidade de nucleotídeos de 0,0111 (π), número médio de diferenças de nucleotídeos de 6,848 (K) e número de sítios segregantes (S) de 25 (Tabela 4). O isolado do presente estudo se encontra no haplótipo H1, composto somente por ele. O maior haplótipo foi o H2, com 5 sequências, enquanto os outros apresentaram apenas 1 ou 2 sequências (Figura 8). Nenhum haplótipo foi compartilhado por isolados de diferentes países, exceto o haplótipo H2. A relação da composição de cada haplótipo se encontra na Tabela 8.

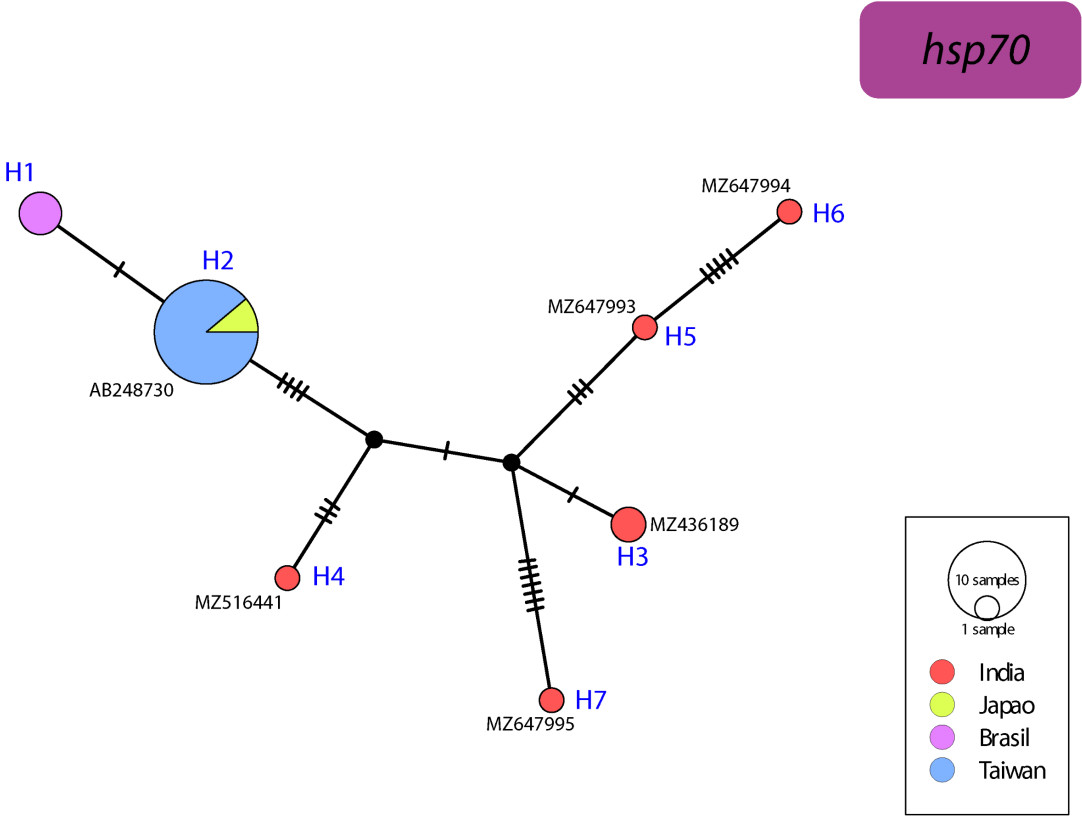


Figura 8. Rede de haplótipos (n=12 - ~600 pb) de isolados de *B. gibsoni* com base no gene *hsp70* e na sua distribuição geográfica por país.

Tabela 8. Relação dos haplótipos com base no gene *hsp70* e no número de acesso do GenBank das suas respectivas sequências.

Haplótipo	Nº de Sequências	Sequências
Hap_1	1	Isolado do presente estudo
Hap_2	5	AB248730, EF584826, FJ763839, FJ763841, FJ763842
Hap_3	2	MZ436189, MZ501174
Hap_4	1	MZ516441
Hap_5	1	MZ647993
Hap_6	1	MZ647994
Hap_7	1	MZ647995

4.0 DISCUSSÃO

O presente estudo relata pela primeira vez a ocorrência de *B. gibsoni* no Brasil utilizando dados clínico-laboratoriais, morfológicos e moleculares. A babesiose causada por esse agente é de importante interesse na clínica de cães. Atualmente *B. vogeli* é o principal agente etiológico da babesiose nesses animais no país (OLIVEIRA et al., 2023). Contudo, *B. gibsoni* está associada a quadros mais graves, com infecções crônicas e pode ser transmitida sem a participação do carrapato como vetor. É mais dificilmente diagnosticada e possui protocolo terapêutico distinto daquele comumente utilizado para *B. vogeli*. Além disso, é um agente com ampla distribuição mundial e endêmico na Ásia e nos Estados Unidos (DEAR; BIRKENHEUER, 2022; KARASOVÁ et al., 2022). Descrever a ocorrência deste caso destaca a necessidade de caracterizar os agentes envolvidos nas infecções por babesiose no país, assim como a realização de estudos epidemiológicos futuros.

O animal infectado do presente estudo era um cão domiciliado da raça Dachshund de 16 anos que vivia em uma chácara no Distrito Federal. No mesmo ambiente a tutora abrigava cães de resgate. Clinicamente o animal apresentava sinais inespecíficos (febre, desidratação, mucosas pálidas, dor), mas comumente observados em cães com babesiose (TEODOROWSKI et al., 2022). A anemia foi um achado hematológico importante considerando que persistiu durante todo o tempo de acompanhamento, chegando a valores muito baixos, como 11% de hematócrito. A fisiopatogenia dessa anemia ocorre principalmente devido ao processo de hemólise intra e extravascular. Esses mecanismos incluem a lise de hemácias por ação direta do parasito, aumento da permeabilidade de membrana das hemácias, aumento de radicais livres e deposição de anticorpos e fatores do sistema complemento sobre eritrócitos (KARASOVÁ et al., 2022). Devido a esse processo, a anemia identificada ao longo dos exames era provavelmente regenerativa na sua maior parte, dado também que o animal apresentou anisocitose e policromasia moderadas, macrocitose, hipocromasia, icterícia sem aumento expressivo das enzimas hepáticas, presença de hemácias nucleadas e corpúsculos de Howell-Jolly. Esses achados são relatados tipicamente em cães infectados por *B. gibsoni* (KARASOVÁ et al., 2022; SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

O animal também possuía resposta inflamatória observada nos leucogramas, com neutrofilia, linfopenia e desvio à esquerda regenerativo. No dia 73, o animal apresentou uma reação inflamatória intensa, chegando a uma reação leucemoide. A liberação de citocinas pró-inflamatórias é um fator de destaque na fisiopatogenia e na gravidade nas infecções ocasionadas por *B. gibsoni*, sendo responsável por alterações em órgãos nos quais o agente não tem ação

direta (BROWN; SHIEL; IRWIN, 2015; TÓTHOVÁ et al., 2020). Essa inflamação pode também ter contribuído para a anemia, considerando a cronicidade da doença e a capacidade de citocinas pró-inflamatórias inibirem a captação e distribuição de ferro assim como a ação da eritropoietina em receptores da medula óssea (STOCKHAM; SCOTT, 2011). As proteínas plasmáticas totais por outro lado se mantiveram dentro dos valores de referência ao longo do tempo. Contudo, não foi realizada a mensuração de albumina e globulina.

Trombocitopenia foi observada em todos os hemogramas. Contudo, agregados plaquetários foram identificados em alguns exames, podendo indicar não se tratar de uma trombocitopenia verdadeira, mas sim de uma pseudotrombocitopenia. A trombocitopenia pode ser explicada pelo consumo ou destruição imunomediada das plaquetas, sendo um achado comum em cães infectados por *B. gibsoni* (KARASOVÁ et al., 2022).

Os achados clínicos e laboratoriais persistiram ao longo de quase um ano, possuindo alternância entre quadros de melhora e piora da condição clínica do animal. Essa característica está associada à não eliminação do agente ao longo do tempo e à baixa resposta à medicação utilizada (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2004; DEAR; BIRKENHEUER, 2022). *B. gibsoni* assim como outras pequenas babesias são responsáveis por infecções crônicas nas quais dificilmente se obtém cura parasitológica, mesmo com melhora clínica do animal (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). Infelizmente não foi realizada a quantificação da parasitemia durante o período de acompanhamento. A última visualização do agente em lâmina de esfregaço sanguíneo ocorreu após 4 meses desde o atendimento inicial, no final de junho de 2022, cerca de 2 meses após a primeira visualização em lâmina.

Quanto à medicação utilizada, foram realizadas duas aplicações de dipropionato de imidocarb com intervalo de 14 dias entre elas, com a primeira no início de julho. Foi associado também o uso de azitromicina durante 30 dias inicialmente, e, depois de 1 mês, por mais 40 dias. Embora o protocolo mais preconizado para *B. gibsoni* consiste no uso de atovaquona mais azitromicina, este protocolo não foi utilizado no presente caso. O uso isolado de dipropionato de imidocarb é recomendado em casos de babesiose por *B. vogeli*, mas não para *B. gibsoni* devido à sua baixa eficácia (KARASOVÁ et al., 2022). O uso da azitromicina se justifica por ser um fármaco que se liga à subunidade 50S do apicoplasto desses parasitos, bloqueando o processo de tradução de mRNA (KARASOVÁ et al., 2022). A atovaquona é um fármaco antiprotozoário que se liga ao citocromo b, utilizado em humanos para tratamento de certas infecções, como por *Plasmodium falciparum* e *Babesia microti* (COTTRELL et al., 2014; TUVSHINTULGA et al., 2022). Na veterinária, é também recomendado nas infecções por *Cytauxzoon felis* em gatos domésticos. Existem duas apresentações comerciais da atovaquona,

Malarone e Mepron, ambas de difícil acesso no Brasil. Nenhuma das duas medicações estava disponível para utilização no animal do presente estudo. Foi realizada, portanto, uma combinação entre dipropinotado de imidocarb e azitromicina.

Poucos marcadores bioquímicos foram mensurados durante o período de acompanhamento do animal. Azotemia renal é um achado relatado em cães infectados por *B. gibsoni*, devido provavelmente à deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais (SOLANO-GALLEGO et al., 2016; TROTTA et al., 2009). Contudo, a creatinina do animal permaneceu dentro dos valores de referência durante todo o tempo. Infelizmente a ureia só foi medida em dois dias. Vale destacar que azotemia renal apenas se faz presente quando cães perdem cerca de 75% da capacidade funcional dos néfrons (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Não foi realizada nenhuma urinálise para avaliação mais criteriosa da função renal. O aumento da atividade enzimática da ALT e da FA também são achados que podem ser observados e podem ocorrer devido ao intenso processo inflamatório e pela hipóxia em tecido hepático pela anemia acentuada. Porém, o valor da ALT se manteve dentro dos valores de referência, exceto no dia 121, em que se registrou um aumento discreto. A FA foi mensurada em apenas dois momentos.

Não é possível determinar qual foi a forma de transmissão desse agente para o animal do presente estudo. Os carrapatos *Haemaphysalis bispinosa*, *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis hystricis* e *Rhipicephalus sanguineus* são os vetores atualmente conhecidos para *B. gibsoni*. Desses, somente *R. sanguineus* tem ocorrência no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019). O animal vivia em uma chácara na qual havia outros cães de resgate, podendo facilmente ter sido exposto ao carrapato. A outra possibilidade de transmissão poderia ter sido por mordida. Essa forma de transmissão é relatada em especial em raça American Pit Bull Terrier e American Staffordshire Terrier, envolvidas em brigas de cães (DEAR; BIRKENHEUER, 2022; JEFFERIES et al., 2007). Embora não foram observados carrapatos no animal, a tutora não relatou fazer uso de produto carrapaticida. Também não relatou ocorrência de lesão compatível com mordida.

O diagnóstico de *B. gibsoni* é desafiador principalmente quando comparado com o de grandes babesias. Esse agente é responsável por infecções crônicas, nas quais pode não haver parasitemia detectável. É também dificilmente visualizado no esfregaço sanguíneo devido ao seu tamanho reduzido (1-3µm), exigindo experiência do patologista clínico, principalmente em regiões de baixa ou nenhuma ocorrência descrita (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Porém, a visualização de uma pequena estrutura em formato de anel dentro de hemácias não permite fechar o diagnóstico. Morfologicamente *B. gibsoni* não se distingue de outras pequenas babesias e pode ser facilmente confundida com artefatos de lâmina. É necessário para elucidação

diagnóstica o uso de outras técnicas como cPCR ou qPCR específicas para a espécie ou sequenciamento de marcadores moleculares (DEAR; BIRKENHEUER, 2022). No presente estudo, no momento inicial foi difícil a visualização das estruturas em lâmina. A observação do agente em lâmina ocorreu somente no dia 73 e 121. Os dados moleculares confirmaram posteriormente se tratar de *B. gibsoni*.

Para a caracterização molecular, foi empregado um protocolo adaptado de Bhoora et al. (2009) com o intuito de amplificar um fragmento extenso do gene 18S rRNA (~1.500 pb). Essa é a primeira sequência depositada de um isolado brasileiro de *B. gibsoni*. Trapp et al. (2006) já havia descrito um isolado brasileiro como *B. gibsoni*, porém foi um fragmento curto com cerca de 400 pb do gene 18S rRNA. O gene 18S rRNA é um marcador conservado dentro da ordem Piroplasmida, podendo haver sobreposição dos valores de identidade com outras espécies próximas, especialmente quando utilizados fragmentos curtos. Esse fenômeno é bem descrito no gênero *Cytauxzoon*, por exemplo (DUARTE et al., 2024). Logo, o uso de fragmentos curtos pode gerar erros de classificação taxonômica, principalmente quando considerada a identidade nucleotídica isoladamente. Outro estudo também relatou a ocorrência de isolados de *B. gibsoni* em cães da região Sul do país (JOJIMA et al., 2008). Contudo, nenhum dado morfológico foi apresentado assim como não foi por Trapp et al. (2006). Não foi realizado também sequenciamento de nenhuma amostra, apenas realizada a técnica de PCR-RFLP com *HinfI* para identificação das espécies, com ocorrência elevada de 39 positivos de um total de 282 animais (JOJIMA et al., 2008). É importante destacar que as limitações técnicas nesses dois estudos se deram ao acesso limitado a outras ferramentas moleculares disponíveis naquele período.

Para caracterização molecular, uma primeira árvore filogenética posicionou o isolado do presente estudo dentro do grupo *Babesia* sensu stricto, em conformidade com o que já era esperado com base na literatura (JALOVECKA et al., 2019). É o mesmo grupo em que se encontram as grandes babesias de cães, *B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli* e *Babesia* sp. coco, além de outras espécies como, como *B. caballi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. odocoilei* (JALOVECKA et al., 2019). Uma segunda árvore usando esse mesmo marcador confirmou que o isolado pertencia a espécie *B. gibsoni* ao se agrupar em um clado monofilético bem suportado. A posição filogenética desse isolado estava, portanto, de acordo com as altas identidades obtidas para os fragmentos dos genes 18S rRNA, *cytb*, *cox3* e *hsp70* obtidos no presente estudo.

Para uma melhor compreensão da posição desse isolado dentro da diversidade genética de *B. gibsoni*, foram realizadas quatro redes de haplótipos, uma para cada marcador. A primeira rede utilizou o gene 18S rRNA. Foi obtida uma diversidade haplotípica moderada e um baixo valor na diversidade de nucleotídeos. Além disso, disso a rede apresentou um aspecto do tipo

“estrela”, ou seja, um haplótipo dominante central, com haplótipos menores ao redor. Esses achados são condizentes com a presença de uma população recente em expansão ou seleção purificadora. Esses achados foram os mesmos identificados por Yin et al. (2023) quando analisado o gene 18S rRNA. Na ocasião foram utilizadas 128 sequências. O teste D de Tajima, um teste de neutralidade, corroborou esse cenário. O presente isolado se agrupou no haplótipo central (H39), que provavelmente é o haplótipo ancestral da espécie ou mais adaptado. Contudo, o gene 18S rRNA possui limitações especialmente no estudo de diversidade intraspecífica. Isso ocorre por ser um marcador conservado e pela existência de parálogos (DUARTE et al., 2024; HRAZDILOVÁ et al., 2019)

Os genes mitocondriais *cytb* e *cox3* por outro lado já são apontados como marcadores mais adequados para diferenciação de espécies próximas e avaliação de diversidade intraespecífica para piroplasmídeos (DUARTE et al., 2024; HRAZDILOVÁ et al., 2019). No presente estudo, foi observado uma diversidade haplotípica elevada para esses dois marcadores, revelando, portanto, uma maior diversidade genética do que a demonstrada pelo gene 18S rRNA. Isso ocorre por serem genes com maior taxa de mutação, sendo, portanto, menos conservados do que o gene ribossomal (HRAZDILOVÁ et al., 2019). Esses marcadores apresentaram também valores moderados na diversidade de nucleotídeos. Contudo, o valor do teste de Tajima D foi positivo, indicando um processo de seleção balanceadora ou estruturação genética dentro da população. Embora o índice *Fst* não tenha sido calculado, percebe-se na rede de haplótipos uma possível diferenciação genética. AMOVA não foi realizado considerando o baixo o número de sequências e a predominância de isolados da China e da Índia nas redes, com poucos isolados de outros países. Para *cytb*, o isolado brasileiro se agrupou no haplótipo com isolados da Hungria. Para *cox3*, que só possuía isolados asiáticos além da do presente estudo, formou-se um haplótipo exclusivo para o isolado brasileiro. Devido ao número limitado de sequências e regiões amostradas não é possível afirmar se o presente isolado é mais próximo geneticamente de isolados asiáticos, europeus ou americanos. Mais sequências mitocondriais de outras regiões geográficas precisam ser caracterizadas e depositadas para uma melhor compreensão da diversidade genética de *B. gibsoni*. Contudo, Yin et al. (2023) demonstrou a existência de diferenciação genética entre populações da América com a Europa, e da América e com a Ásia. Isso poderia justificar a presença de um haplótipo exclusivo para o isolado brasileiro nas redes com *cox3* e *hsp70*, que possuem somente sequências asiáticas e a brasileira. O gene *hsp70* por sua vez se mostrou mais conservado que os mitocondriais, porém menos que o gene 18S rRNA com base na sua diversidade haplotípica e de nucleotídeos. Infelizmente existem poucas sequências depositadas.

O uso de técnicas moleculares permitiu não só a detecção do agente como também permitiu sua caracterização genética. Os dados obtidos confirmaram a alta diversidade genética dentro da espécie. Contudo, essa diversidade está mais bem caracterizada para os isolados da Ásia, região em que o agente é endêmico. Para os isolados americanos e europeus, as sequências estão mais limitadas ao gene 18S rRNA, marcador que no presente estudo se mostrou mais conservado que os genes mitocondriais *cytb* e *cox3* e o gene nuclear *hsp70*. É necessário que esses isolados sejam caracterizados adequadamente para que se tenha uma melhor compreensão da dinâmica populacional de *B. gibsoni* no continente americano e europeu, visto que tem sido considerado como um possível agente emergente em alguns países nos últimos anos.

Uma alta diversidade haplotípica pode estar associada a diferentes fatores desde a um número efetivo populacional alto, o que é observado em países com grande número de casos como na Índia (DEEPA et al., 2023; JAIN et al., 2017), como também com a estruturação de populações. A introdução do agente em novas regiões pode contribuir também com o aumento dessa diversidade.

5.0 CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível, pela primeira vez, descrever com robustez a ocorrência de *B. gibsoni* no Brasil, especificamente no Distrito Federal, por meio da associação de dados clínico-laboratoriais, moleculares e morfológicos. O animal no presente estudo apresentou anemia persistente, com baixa resposta clínica ao tratamento com dipropionato de imidocarb, além de leucograma com padrão inflamatório importante, chegando a ter uma reação leucemoide. Pequenas estruturas em formato de anel foram visualizadas no interior de hemácias, sendo compatíveis morfológicamente com piroplasmídeos. A caracterização molecular nesse caso foi importante não só para a identificação do agente como *B. gibsoni*, como também na elucidação da posição desse isolado dentro da diversidade genética da espécie. Para o gene 18S rRNA, o isolado brasileiro se agrupou no principal haplótipo da espécie (H39). Para *cytb* e *cox3*, demonstrou-se a alta diversidade genética desse grupo e que isolado brasileiro não se agrupou com nenhum haplótipo asiático. Para *cytb*, agrupou-se apenas com isolados europeus da Hungria. Para *cox3* e *hsp70*, formou-se um haplótipo exclusivo. Contudo, devido à quantidade restrita de sequências e regiões analisadas, não é possível afirmar se o isolado em questão possui maior proximidade genética com isolados asiáticos, europeus ou americanos.

6.0 Referências bibliográficas

BHOORA, R. et al. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 112–120, fev. 2009.

BIRKENHEUER, A. J. et al. *Babesia gibsoni* cytochrome b mutations in canine blood samples submitted to a US veterinary diagnostic laboratory. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1965–1969, nov. 2018.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. 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 of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, set. 2003.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Efficacy of Combined Atovaquone and Azithromycin for Therapy of Chronic *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) Infections in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2004.

BROWN, A. L.; SHIEL, R. E.; IRWIN, P. J. Clinical, haematological, cytokine and acute phase protein changes during experimental *Babesia gibsoni* infection of beagle puppies. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 185–196, out. 2015.

COTTRELL, G. et al. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4504–4514, ago. 2014.

DANTAS-TORRES, F. et al. Molecular epidemiology and prevalence of babesial infections in dogs in two hyperendemic foci in Brazil. **Parasitology Research**, v. 120, n. 7, p. 2681–2687, jul. 2021.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101252, out. 2019.

DEAR, J. D.; BIRKENHEUER, A. *Babesia* in North America. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1193–1209, nov. 2022.

DEEPA, C. K. et al. Phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* isolates of south India using apical membrane antigen, 50 kDa surface antigen, and 70 kDa heat shock protein genes. **Experimental Parasitology**, v. 246, p. 108461, mar. 2023.

DISCH, J. et al. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2003.

DUARTE, M. A. et al. *Cytauxzoon brasiliensis* sp. nov. (Apicomplexa: Theileriidae), a new species infecting a little-spotted-cat (*Leopardus tigrinus*) (Carnivora: Felidae) from Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 101, n. 5, p. 53, out. 2024.

GUO, W.-P. et al. Molecular detection and genetic characteristics of *Babesia gibsoni* in dogs in Shaanxi Province, China. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 366, dez. 2020.

HRAZDILOVÁ, K. et al. Paralog vs. genotype? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. **Veterinary Parasitology**, v. 266, p. 103–110, fev. 2019.

INOKUMA, H. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 265–271, jun. 2002.

JAIN, K. J. et al. High prevalence of small *Babesia* species in canines of Kerala, South India. **Veterinary World**, v. 10, n. 11, p. 1319–1323, nov. 2017.

JALOVECKA, M. et al. *Babesia* life cycle – when phylogeny meets biology. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 5, p. 356–368, maio 2019.

JEFFERIES, R. et al. Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 11, p. 459–463, nov. 2007.

JOJIMA, F. S. et al. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 17, supl. 1, p. 277–283, 2008

KARASOVÁ, M. et al. The etiology, incidence, pathogenesis, diagnostics, and treatment of canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni* infection. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 739, 16 mar. 2022.

OLIVEIRA, Á. F. X. D. et al. Molecular detection of hemoplasmas in rescued black-eared opossums (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826) from southeastern Brazil, with evidence of a novel genotype infecting marsupials. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 2, 2023.

PAROLA, P. et al. Detection of *Ehrlichia* in African ticks by polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 707–708, 2000.

SCHREEG, M. E. et al. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165702, 2016.

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 203–208, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 336, dez. 2016.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729 p. ISBN 978-85-277-1740-3.

TEODOROWSKI, O. et al. *Babesia gibsoni* infection in dogs—A European perspective. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 730, 14 mar. 2022.

TRAPP, S. M. et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1–2, p. 177–180, out. 2006.

TROTTA, M. et al. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3–4, p. 318–322, nov. 2009.

TUVSHINTULGA, B. et al. Combination of clrofazimine and atovaquone as a potent therapeutic regimen for the radical cure of *Babesia microti* infection in immunocompromised hosts. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 2, p. 238–242, 18 jan. 2022.

YIN, F. et al. Analysis of genetic diversity and population structure of *Babesia gibsoni*. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.