

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO E DA
TRANSMISSÃO DA *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALERIO,
1895) PELO *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)
NO BRASIL**

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

1996

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO E DA
TRANSMISSÃO DA *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALERIO,
1895) PELO *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)
NO BRASIL**

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:
Dr. CARLOS LUIZ MASSARD

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau
de *Magister Scientiae* em
Medicina Veterinária –
Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO, 1996

TÍTULO DA TESE

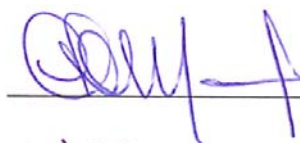
**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO E DA
TRANSMISSÃO DA *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALERIO,
1895) PELO *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)
NO BRASIL**

AUTORA

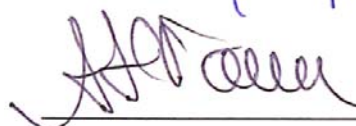
LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

APROVADA EM: 27/02/1996

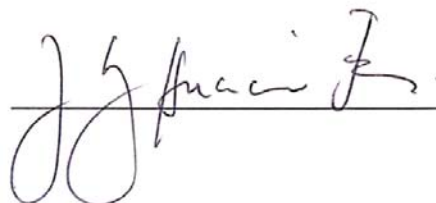
Dr. CARLOS LUIZ MASSARD
Orientador



Dr. ADVALDO HENRIQUE DA FONSECA



Dr. JOÃO LUIZ HORÁCIO FACCINI



DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Herminia e Dilton
Pelo seu amor que significa
tudo para mim.*

*Aos meus irmãos
Gisele e Maurício
e familiares,
pelo carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. CARLOS LUIZ MASSARD, pela confiança, amizade e orientação.

Aos professores CARLOS WILSON GOMES LOPES e ERIK DAEMON, pois suas sugestões e amizade foram essenciais para a execução deste trabalho.

Às colegas SIMONI MACHADO DE MEDEIROS, MARIA ELISA CARNEIRO e LANASSA GUIMARÃES, pela amizade e apoio durante todo o período da pesquisa.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial aos senhores ARCHANJO GONÇALVES e OSWALDO SILVA, pelo cuidado com os cães.

A todos os colegas de curso, professores e funcionários do Departamento de Parasitologia Animal, que tornaram minhas atividades na UFRRJ mais agradáveis.

Ao Dr. WILSON JACINTO DE SOUZA, por ter me incentivado e me apresentado à Parasitologia da UFRRJ.

Aos amigos do Instituto Jorge Vaitsman, pelo apoio constante.

A PATRÍCIA O'DWYER, pela revisão lingüística da Tese.

Aos cães utilizados durante esta pesquisa, pela docilidade e enorme paciência, o respeito que eles merecem.

A Universidade Federal de Viçosa, pela base da minha formação técnica.

A UFRRJ, ao CNPq/CAPES, à coordenação do CPGMV/PV, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todos que de certa forma contribuíram para que este trabalho fosse executado.

A DEUS.

BIOGRAFIA

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA, filha de Dilton Barreto de Oliveira e Hermínia O'Dwyer de Oliveira, nasceu a 28 de Setembro de 1965 na cidade de São Paulo.

Em 1971 transferiu-se para o Rio de Janeiro, onde concluiu o 1º e o 2º grau no Colégio Santo Inácio.

No ano de 1983 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 1987.

Durante três anos trabalhou no Instituto Vital Brazil, em Niterói, e em 1991 ingressou, através de concurso público, para Médico Veterinário no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, Rio de Janeiro, onde desempenha suas funções como parasitologista junto àquele órgão municipal.

Em 1994 foi selecionada e ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, licenciando-se de suas funções junto ao Município do Rio de Janeiro.

ÍNDICE

	Págs.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Ciclo biológico de <i>Babesia canis</i> no invertebrado	3
2.2. Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Babesia</i> no invertebrado.....	11
2.3. Aspectos da transmissão da <i>Babesia canis</i> pelo carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Local do experimento	20
3.2. Estudo da <i>Babesia canis</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado	20
3.2.1. Obtenção e manutenção dos animais	20
3.2.2. Obtenção da amostra de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	21

3.2.3. Manutenção de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em coelhos e cães: metodologia de infestação	22
3.2.4. Obtenção de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> positivos para <i>Babesia canis</i> , em condições laboratoriais	22
3.2.5. Estudo das fases evolutivas de <i>Babesia canis</i> nas fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	24
A. Exame da hemolinfa	24
B. Exame dos órgãos internos	25
C. Exame de ovos.....	26
3.2.6. Estudo das fases evolutivas de <i>Babesia canis</i> nas larvas e ninfas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	26
3.2.7. Estudos morfométricos das formas evolutivas de <i>Babesia canis</i> no carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e no hospedeiro vertebrado ..	27
3.3. Transmissão da <i>Babesia canis</i> por <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	28
3.3.1. Obtenção de larvas, ninfas e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , positivos para <i>Babesia canis</i>	28
3.3.2. Infestações dos cães	29

	Págs.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Aspectos morfológicos da <i>Babesia canis</i> no carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	30
4.2. Transmissão da <i>Babesia canis</i> por <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	42
4.3. Observações de hemoparasitos no hospedeiro vertebrado	43
5. CONCLUSÃO.....	49
6. Referências BIBLIOGRÁFICAS	50
7. APÊNDICES	59

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Formas evolutivas de <i>Babesia canis</i> no intestino de fêmeas do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , com até 24 horas de desprendimento. Giemsa (— = 10 µm)	31
FIGURA 2. Formas evolutivas de <i>Babesia canis</i> no intestino de fêmeas do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , a partir do 10º dia do desprendimento. Giemsa (— = 10 µm).....	33
FIGURA 3. A, B, C, D, E, F, G e H. Esporocinetos de <i>Babesia canis</i> na hemolinfa do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Giemsa (— = 10 µm).....	36

FIGURA 4. Formas evolutivas de <i>Babesia canis</i> no ovário e ovos de fêmeas do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Giemsa (— = 10 µm)	37
FIGURA 5. Formas evolutivas de <i>Babesia canis</i> em macerados de larvas e ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Giemsa (— = 10 µm)	41
FIGURA 6. Formas intra-eritrocíticas de <i>Babesia canis</i> coradas pelo método de Giemsa (— = 10 µm)	45
FIGURA 7. A. Formas eritrocitárias de <i>Haemobartonella canis</i> . Giemsa (— = 10 µm). B. Forma gametocítica, intraleucocitária de <i>Hepatozoon canis</i> . Giemsa (— =10 µm)	46

INDICE DOS APÊNDICES

	Págs.
APÊNDICE I. Infecção múltipla por hemoparasitos de cães: Relato de um caso.....	60
APÊNDICE 2. Transmissão biológica de <i>Babesia canis</i> (Piana & Galli-Valerio, 1895) por ninfas e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	65

RESUMO

Foram realizados estudos referentes ao desenvolvimento de *Babesia canis* (Piara & Galli-Valerio, 1895) no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), mantidos em coelhos por dez gerações sucessivas. Posteriormente, larvas, ninfas e adultos foram alimentados em cães positivos para *B. canis*. Os carrapatos ingurgitados foram examinados de forma sistemática, avaliando a hemolinfa, o tubo digestivo e o ovário de fêmeas ingurgitadas, ovos, e o corpo de larvas e ninfas através de macerados dos órgãos corados pelo método de Giemsa.

Os estágios evolutivos nos diferentes sistemas do corpo das fêmeas, bem como nos ovos, larvas e ninfas foram caracterizados por comparação com dados de outros autores.

A fusão de gametas não foi observada, porém, estágios posteriores sugerem que ela tenha ocorrido. A transmissão transestadial e a passagem pelo ovário e ovos comprovam a existência da transmissão vertical.

SUMMARY

The development of *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) was studied. Several samples of the ticks were collected from naturally infested dogs and maintained on rabbits during ten successive generations. Afterwards larvae, nymphs and adults were exposed to dogs infected with *B. canis*. After engorging, larvae, nymphs and hemolymph, gut, ovary and eggs from the females were smeared on microscope slides, fixed with methanol and stained with Giemsa for examination by light microscopy. The developmental stages of *B. canis* were characterized by comparison with data of other authors.

Syngamy was not observed, however posterior stages suggested that it had occurred. The transtadial transmission and the passage through ovary and eggs confirm the existence of vertical transmission.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são os únicos vetores biológicos de parasitos da família Babesiidae, sendo que das 71 espécies conhecidas do gênero *Babesia* Starcovici, 1893, 18 causam doença nos animais domésticos (LEVINE, 1971).

O ciclo biológico desses parasitos no carrapato vem sendo estudado desde o início do século, quando KOCH (1906) demonstrou diversas formas de *Babesia bigemina* no carrapato *Boophilus annulatus*. Os estágios de desenvolvimento de *Babesia* spp. vêm sendo observados em diversas espécies de carrapatos vetores. Entretanto, apesar das novas técnicas de microscopia óptica e do auxílio da microscopia eletrônica, ainda existem lacunas e dúvidas quanto a natureza deste ciclo, principalmente no que diz respeito aos estágios sexuais no vetor. No Brasil poucos estudos têm sido realizados sobre este assunto e a respeito de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), nenhuma informação foi até então relatada.

Assim, o objetivo deste trabalho foi observar e identificar a presença e os estágios do ciclo biológico de *B. canis* em diferentes órgãos de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, bem como de larvas e ninfas ingurgitadas, como também identificar os estágios do carrapato que transmitem a *B. canis* entre cães domésticos no Brasil, tendo em vista que parasitos de ampla distribuição geográfica podem sofrer variações interregionais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ciclo biológico de *Babesia canis* no invertebrado

Parasitas do gênero *Babesia* Starcovici, 1893 foram primeiramente reconhecidos por Babés em 1888. Nesta época o pesquisador procurava determinar a causa de uma doença grave, que estava acometendo os bovinos no delta do rio Danúbio, na Romênia. O autor chegou a conclusão que o agente etiológico que estava provocando a enfermidade, naquela região denominada hemoglobinúria enzoótica, era um pequeno organismo cocóide, intraeritrocítico, por ele chamado de *Haematococcus bovis*. **Em** 1893, STARCOVICI, um dos pesquisadores do grupo de Babés, reavaliou o parasito, denominando-o *Babesia bovis*, em homenagem a seu descobridor.

Ainda em 1893, SMITH & KILBORNE, estudando a etiologia da febre do Texas, na América do Norte, concluíram que se tratava de um agente semelhante

ao parasito de Babes, denominando-o de *Pyrosoma bigeminum* e desconsideraram a denominação prévia dada por Starcovici para parasitos do mesmo gênero. Estes pesquisadores pela primeira vez estabeleceram a relação da transmissão de um protozoário patogênico por um artrópode, no caso o ixodídeo *Boophilus annulatus*. Esta descoberta abriu um enorme campo de pesquisa sobre o papel desempenhado por estes organismos na transmissão de inúmeras doenças.

PIANA & GALLI-VALERIO descreveram a *B. canis*, em 1895, na Itália. A doença provocada nos cães era conhecida como “Malignant jaundice” e “Malignant malarial fever”. A partir de sua descrição, esta espécie foi diagnosticada em várias regiões da Europa, África, Ásia e Américas (MALHERBE, 1968), sempre acometendo canídeos.

CHRISTOPHERS (1907) estudou o ciclo biológico da *B. canis* nos carrapatos de cães, elucidando diversos pontos em relação à transmissão e aos aspectos morfológicos dessa espécie no seu vetor. O autor descreveu a presença de parasitos em forma de clava (vermículos) no intestino e sua formação a partir de formas arredondadas.

O ciclo biológico da *B. canis* no vetor foi novamente estudado por REGENDANZ (1932) e REGENDANZ & REICHENOW (1933). Estes autores concluíram que os primeiros estágios de desenvolvimento, após a *B. canis* abandonar o lúmen intestinal do carrapato, ocorrem nas células da parede intestinal. Dentro

dessas células, um único indivíduo se multiplica por fissão binária, produzindo um número grande de formas semelhantes, porém, menores. Estes parasitos claviformes migram do seu lugar de origem nas células intestinais para os outros órgãos, incluindo os ovários por onde penetram nos ovos.

SHORTT (1936) ao realizar um estudo mais completo dos aspectos morfológicos da *B. canis* no carrapato *R. sanguineus*, utilizou cortes histológicos. O autor caracterizou as formas de *B. canis* em ninfas ingurgitadas, em adultos infectados verticalmente e em fêmeas ingurgitadas. O autor não conseguiu demonstrar nos cortes histológicos os primeiros estágios de desenvolvimento do parasito após a ingestão de sangue infectado. Quatro a cinco dias após as ninfas terem se desprendido de um animal infectado, o autor encontrou células parasitadas abaixo da camada epidermal do carrapato. Nessa etapa, o parasito foi caracterizado como um corpo globoso pequeno, com uma única massa cromática localizada centralmente. Com o desenvolvimento desse corpo, a massa de cromatina se expande e inicia uma divisão contínua que originará o que o autor denominou de “pseudocisto”. Sete dias após o desprendimento das ninfas, o “pseudocisto” encontra-se maduro, com a sua forma tendendo a esférica ou oval, contendo um grande número de corpos com tamanhos variáveis, uninucleares e esféricos ou ovais. Estes corpos aumentam de tamanho e a grande maioria parece ser cortada por uma linha acromática que ao invés de dividir o parasito em dois, o converte em um

parasito com uma região mais larga, contendo o núcleo, ligada a uma região mais atenuada. Este desenvolvimento leva à formação dos parasitos em forma de clava, semelhantes aos descritos por CHRISTOPHERS (1907). Onze dias após o desprendimento, foram encontrados pseudocistos repletos de parasitos claviformes em vários estágios de desenvolvimento. Os parasitos mais maduros são mais compridos e com os perfis uniformes, enquanto os mais jovens tendem a ser mais largos em uma extremidade e mais afilados na outra. Esses parasitos são móveis e após abandonarem o “pseudocisto”, não tendo sido citado pelo autor se pela ruptura deste ou não, *migram* para a musculatura do carrapato. Vinte e um dias após o desprendimento da ninfa, podendo já ter ocorrido a ecdise do adulto, praticamente todas as formas evolutivas de *B. canis* foram encontradas na musculatura. Neste estágio o parasito se arredonda, formando grandes corpos subovais, cuja cromatina nuclear começa a se fragmentar de forma irregular, iniciando o processo de multiplicação que vai originar um certo número de parasitos menores. Os parasitos formados são relativamente uniformes e possuem um único núcleo. Não há infecção em outros órgãos até que o carrapato adulto inicie a alimentação. Três dias após a fixação do carrapato adulto, a glândula salivar encontra-se infectada. Prosseguindo seu trabalho, SHORTT (1936) examinou fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas em cães infectados, dando particular atenção ao estudo da infecção do ovário. O autor encontrou parasitos em forma de clava nos ovos maduros, assim como, formas

irregulares tendendo a ovais, com tamanhos variáveis, presentes tanto nos ovos quanto nos folículos ovarianos. Esses parasitos variaram de grandes formas uni ou binucleares, passando por formas multinucleares, até parasitos pequenos, uninucleares, representativos do estágio final de desenvolvimento no ovo. Nas larvas recém eclodidas, foram encontrados parasitos semelhantes aos observados nos ovos.

SHORTT (1973) realizou um estudo bastante apurado a respeito do ciclo da *B. canis* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado (*R. sanguineus* e *Haemaphysalis leachi*). O autor não encontrou diferenças morfológicas entre diferentes amostras de *B. canis*. Após a invasão do ovário por estágios claviformes da *B. canis*, os ovos também podem ser infectados. Depois da penetração, os parasitos continuaram o processo de divisão, aumentando seu número no interior dos ovos. No exame de macerado de ovos, os exemplares de *B. canis* variaram de forma e tamanho, tendendo a serem ovais, embora algumas formas mais angulares e alongadas também estivessem presentes. Não houve variação significativa dos parasitos em relação à idade dos ovos, não sendo observado, com frequência, formas claviformes nesses macerados. Examinando larvas alimentadas em cães infectados, o autor observou que mesmo quando o carrapato se alimentou de sangue fortemente parasitado, ocorreu uma massiva destruição dos parasitos no lúmen intestinal, levando a uma diminuição do número de *Babesia* encontradas nos esfregaços. Nas primeiras 24 horas de desprendimento, o autor encontrou corpos ovais ou arredondados com citoplasma claro e com um a dois núcleos. Os parasitos variaram de

tamanho. Quarenta e oito horas depois do desprendimento, foram encontradas formas angulares com citoplasma azul claro e núcleo bem visível. Alguns parasitos apresentavam um pequeno vacúolo no citoplasma. Depois de 72 horas, continuaram predominando formas arredondadas do protozoário, algumas em processo de divisão. Formas alongadas e uninucleares também foram observadas. O autor encontrou o que ele denominou de “pseudocisto”, quatro a seis dias após o desprendimento. No estudo de ninfas ingurgitadas, foram encontrados — nos primeiros dois a quatro dias após a repleção — corpos únicos, em sua maioria ovais, porém, com a presença de algumas formas alongadas. No segundo ou terceiro dia, as formas evolutivas de *B. canis* penetraram em células que não foram identificadas pelo autor. As primeiras formas invasoras foram globulares e uninucleadas com aproximadamente 5 µm de diâmetro. O núcleo demonstrou aumento de tamanho, indicativo de início de divisão. A expansão da cromatina levou à fragmentação da mesma. Cinco dias após o desprendimento, o citoplasma do “pseudocisto” começou a se condensar ao redor da cromatina, formando vários corpos uninucleares. No 7º ou 8º dia, o “pseudocisto” continha parasitos claviformes. Após o 10º dia, essas formas claviformes se liberaram do “pseudocisto”, e como eram móveis, invadiram a hemolinfa e posteriormente atingiram a musculatura. No adulto não alimentado, esses parasitos se arredondaram e iniciaram um processo de divisão binária, produzindo um grande número de parasitos filhos. Esses permaneceram latentes até que o carrapato iniciou o repasto sanguíneo. A alimentação estimulou os

parasitos latentes e esses iniciaram migração em direção A. glândula salivar. Três a quatro dias após o início da alimentação, a glândula salivar encontrava-se infectada. Os protozoários iniciaram uma nova série de divisões, dando origem aos esporozoítas infectantes. No entanto, os eventos ocorridos, quando um carrapato livre de *B. canis* iniciou o repasto em um cão infectado, foram bastante diferentes. No intestino foram encontrados parasitos uninucleares, com formas variáveis. Alguns possuíam processos alongados, podendo ser mais ou menos afilados e correspondendo aos corpos raiados descritos por KOCH (1906). Outras formas encontradas eram claviformes e foram estas que provavelmente possuíam capacidade de atravessar o epitélio intestinal e atingir os outros órgãos do carrapato. As formas de *B. canis* mais comumente encontradas no intestino foram formas triangulares com uma projeção no ângulo mais agudo, formas quadrangulares com várias projeções, formas alongadas com extremidades cônicas e projeções em uma ou ambas as extremidades. Formas ovais com o núcleo em diversas posições também foram citadas. O autor especulou que se existe alguma diferenciação sexual que possa levar à união de gametas, essa deve ocorrer nesta fase inicial do ciclo. Um fato que sugere a diferenciação sexual, segundo o autor, é que alguns parasitos se coram mais fracamente, podendo representar gametas masculinos, semelhantes aos da malária. O autor também encontrou parasitos com coloração diferenciada e justapostos, podendo sugerir unia união de gametas. Estas questões, entretanto, não puderam ser confirmadas pelo pesquisador .

SHEIN *et alii* (1979) estudaram a formação de esporozoítas de *B. canis* na glândula salivar de fêmeas adultas de *Dermacentor reticulatus*, a partir do segundo dia de fixação até um dia após o desprendimento. O processo se iniciou com cinetos que penetraram na glândula salivar antes ou durante o período de estudo. Após repetidas divisões binárias, os parasitos adquiriram cada vez mais a forma piriforme dos esporozoítas infectantes. O processo de formação necessita de dois a três dias de alimentação do carrapato, para que possa haver transmissão ao cão, sendo o repasto o estímulo necessário a esse desenvolvimento.

MEHLHORN *et alii* (1980) estudaram os estágios de *B. canis* no intestino do carrapato *D. reticulatus*. Os autores observaram que três dias após a ingestão de sangue infectado, a maioria dos parasitos intraeritrocíticos piriformes são lisados. Apenas os estágios ovais continuam seu desenvolvimento, iniciado no final do período de fixação ou imediatamente após o desprendimento do carrapato. No interior do lúmen intestinal, numerosos eritrócitos mantêm sua forma e contêm no seu interior parasitos ovóides com 4 a 5 µm de diâmetro. Alguns desses parasitos ovais desenvolvem até seis projeções em forma de espinho. Durante a digestão do eritrócito, os parasitos ovais e os com projeções são liberados no lúmen intestinal, e esses são todos encontrados no citoplasma das células intestinais aproximadamente dois dias depois. A partir disso, ocorre uma grande variedade de estágios geralmente muito próximos uns dos outros e sem uma sequência cronológica, que são: estágios uninucleares esféricos de 6 a 7 µm de diâmetro, com um pequeno

“espinho”, mas sem protrusões; estágios uninucleares polimórficos com duas a oito protrusões e um pequeno espinho, semelhante ao descrito no estágio anterior; estágios em forma de fuso contendo até oito núcleos com quatro a 10 protrusões em um polo e uma projeção mais grossa no outro; estágios polimórficos e multinucleares com 10 projeções e um pequeno espinho; estágios delgados com um único núcleo e de 4 a 8 projeções em um polo; e por último, estágios ovais com um núcleo relativamente grande e periférico. Iniciando-se três dias após o desprendimento, os estágios “raizados” se tomam raros ou degeneram, e ao contrário desses, os estágios ovais se desenvolvem formando cinetos. Os autores sugerem que os estágios ovais intraeritrocíticos possam ser gamontes; aqueles com protrusões seriam os microgamontes e os sem projeções, os macrogamontes. A diferenciação dos gamontes no intestino da fêmea ingurgitada levaria à singamia com formação de cinetos móveis; singamia esta que não foi ainda observada.

2.2. Ciclo biológico de parasitos do gênero *Babesia* no invertebrado

Apesar do presente estudo ter como objeto de interesse — o ciclo da *B. canis* no carrapato *R. sanguineus* — alguns trabalhos considerados importantes para o entendimento do ciclo geral da *Babesia* no seu vetor serão citados:

KOCH (1906) foi o primeiro a estudar o desenvolvimento de uma espécie de *Babesia* nos carrapatos, demonstrando a presença de diversas formas de *B. bigemina* no

intestino, ovos e hemolinfa do *B. annulatus*. Esse autor descreveu o que chamou de “strahlenkörper” (ou corpos raiados), encontrados no intestino das fêmeas ingurgitadas, citando-os como os estágios iniciais de desenvolvimento daquele parasito.

Em 1932, DENNIS pesquisou o ciclo da *B. bigemina* no vetor *B. annulatus* e identificou um ciclo assexuado, por divisão binária, que ocorre no hospedeiro vertebrado e um ciclo sexuado que ocorre no invertebrado, observando a fusão de “isogametas” na luz intestinal, com a formação de oocinetos, alongados e em forma de clava. Segundo este autor, os vermículos atravessam a parede intestinal, distribuindo-se pelos vários órgãos do carrapato, incluindo ovário e glândula salivar. Nos diferentes órgãos, o parasito se arredonda e inicia um processo de divisão assexuada, formando o esporoblasto que por sua vez contém os esporocinetos móveis. As formas infectantes são formadas na glândula salivar e são denominadas de esporozoítos, nome também sugerido por CHRISTOPHERS (1907).

RIEK (1964), estudando o ciclo biológico da *B. bigemina* em *B. microplus* alimentados em bovinos experimentalmente infectados, observou que durante as primeiras 24 horas após a repleção, pode-se encontrar parasitos dentro de hemácias intactas no conteúdo intestinal do carrapato. O autor notou que várias formas eritrocíticas ingeridas eram destruídas e somente as formas arredondadas ou ovais sobreviviam no intestino do vetor. Vinte e quatro horas após a repleção, foram encontradas estruturas fusiformes, com a massa de cromatina localizada centralmente, dentro das células

epiteliais do intestino. Entre 48 a 60 horas, ocorreu a multiplicação por fissão binária, que originou um grande número de corpos em forma de clava, na luz intestinal. Estes corpos em clava migram através da parede intestinal atingindo a hemolinfa, a partir da qual, após atingirem a maturidade, invadem vários órgãos da cavidade geral. Nos hemócitos, uma segunda multiplicação por fissão múltipla origina novos vermículos, iguais aos formados nas células epiteliais. Foi também assinalada a invasão do ovário e a consequente transmissão vertical para as larvas. Nas larvas a *B. bigemina* também se multiplica a nível de células intestinais. O final do ciclo evolutivo no vetor ocorre na glândula salivar com a formação das formas infectantes ao vertebrado.

FRIEDHOFF & BUSCHER (1976) examinaram amostras de conteúdo intestinal de fêmeas de *B. microplus* infectadas por *B. bigemina*. Foram observados um grande número de parasitos com aspecto raiados (“Strahlenkorper”) e com grande variação de morfologia e de tamanho, durante o período de sete a 19 horas de incubação. Apesar das evidências da existência de reprodução sexuada, os autores não conseguiram comprovar sua existência.

RUDZINSKA *et alii* (1979) evidenciaram que *B. microti* possui dois tipos morfológicos distintos durante o estágio intraeritrocítico. Em um, os trofozoítos diferenciam-se e reproduzem-se, formando merozoítos. No outro, não ocorre nem diferenciação nem reprodução e os parasitos adquirem formas não usuais. Esses últimos são considerados como possíveis gametócitos. No intestino do vetor, os parasitos, que

emergem dos eritrócitos lisados, são semelhantes aos gametócitos intraeritrocíticos. Fora dos eritrócitos, ocorre metamorfose com formação de projeções no citoplasma. Em um único gametócito até três projeções podem ser encontradas, cada uma representando um suposto gameta. Apesar dos resultados dos experimentos sugerirem fusão de gametas, os autores não descartam a idéia de terem observado somente um processo de divisão, concluindo serem necessárias outras investigações para comprovar a existência de reprodução sexuada.

RUDZINSKA *et alii* (1983) comprovaram a reprodução sexuada da *B. microti* demonstrando pela primeira vez que esta acontece em um piroplasma. Segundo os autores, a fertilização de *B. microti* não é fácil de ser observada, pois os parasitos são muito pequenos para serem acompanhados pela microscopia óptica e, também, por eles não serem diferenciados em macro e microgametócitos. Desse modo, os estudos da fertilização só puderam ser realizados através da microscopia eletrônica. Outra dificuldade foi diferenciar a fusão de gametas da divisão do parasito. Este problema também foi encontrado por MEHLHORN *et alii* (1981) nos seus estudos ultraestruturais de supostos gametas e singamia de *B. canis* “*in vitro*”. Para resolverem estes problemas, os autores procuraram observar a fusão entre dois parasitos que estivessem emergindo de eritrócitos vizinhos. Os autores descreveram e ilustraram a fusão de pares de organismos que se originaram de eritrócitos diferentes, provando que os dois organismos representavam gametas e que ocorreu singamia com formação de zigoto.

HIGUCHI *et alii* (1990) estudaram o desenvolvimento da *B. gibsoni* no epitélio intestinal do carrapato *H. longicornis*. Formas arredondadas de *B. gibsoni* foram encontradas nas células epiteliais do intestino do carrapato, oito dias após repleção. Os parasitos mediram entre 7,0 - 9,0 µm de diâmetro, com núcleo na região periférica e citoplasma corado de azul claro pelo Giemsa. Com o crescimento dessas formas nas células intestinais, o citoplasma e a cromatina se dividem em corpos vacuolares de forma irregular. Durante este período foram observadas formas invaginantes com vacúolos, formas “retort-shaped “ e parasitos claviformes (cinetos) com uma região arredondada e outra afilada. Continuando suas observações, HIGUCHI *et alii* (1991) acompanharam o desenvolvimento da *B. gibsoni* na hemolinfa do vetor *H. longicornis*. Dez dias após o ingurgitamento, grandes parasitos claviformes semelhantes a cinetos apareceram na hemolinfa dos carrapatos adultos. Estes parasitos mediam de 13,21 - 16,25 x 1,7 - 2,62 µm e apresentavam uma região anterior arredondada e a posterior afilada; possuíam “cap” na extremidade arredondada e núcleo irregular localizado centralmente ou não. Foram classificados dois tipos de cinetos, um com o citoplasma rico em vacúolos e outro sem vacúolos. O número de cinetos na hemolinfa aumentou com o tempo, atingindo o máximo no 12º dia após o ingurgitamento, e decrescendo até o 30º dia, quando não foi encontrado nenhum parasito. De acordo com os autores, tanto o tamanho dos cinetos de *B. gibsoni* quanto seu tempo de aparecimento na hemolinfa são similares aos de *B. canis*.

ZAPF & SCHEIN (1994a) pesquisaram o desenvolvimento da *B. equi*, no

intestino e na hemolinfa de três espécies diferentes de *Hyalomma*. Os resultados foram idênticos nas três espécies. Durante os três primeiros dias após infestação de ninfas, foram encontradas formas em anel intra e extra-eritrocíticas, de *B. equi* no conteúdo intestinal dos carrapatos. Essas formas em anel apresentam citoplasma avermelhado com um núcleo compacto esférico, situado na posição marginal. Entre 48 e 72 horas após a infestação, a maioria das formas livres aumentam rapidamente de tamanho, se transformando em corpos multinucleados, com dois ou mais núcleos indistintos e dispersos. Todos estes estágios foram identificados como microgamontes. No terceiro e quarto dias após infestação, a maioria dos corpos multinucleados se partiram, começando da periferia e formando massas de estágios alongados com diferentes formas e tamanhos e com projeções do citoplasma (corpos raiados). Estes corpos desaparecem em horas, e somente parasitos fusiformes, uninucleados, similares a macrogametas podem ser observados. Simultaneamente, algumas formas arredondas com um núcleo central permanecem inalteradas e foram consideradas como macrogametas. Apesar da fusão de gametas não ter sido demonstrada, algumas das formas em anel pareciam ser binucleadas. Nem gamontes e nem gametas foram observados a partir do quarto dia após infestação. Do quarto dia até o sexto dia, formas arredondadas com uma pequena projeção em forma de espinho no citoplasma foram encontradas no interior de células intestinais das ninfas e foram consideradas como macrogametas fertilizados. Entre os dias quatro e sete, essas formas arredondadas aumentaram consideravelmente de tamanho, perdendo a projeção e

se desenvolvendo em um zigoto esférico típico. Zigotos imaturos apresentam um citoplasma homogêneo e material nuclear distinto, geralmente condensado em um polo. Zigotos maduros possuem o citoplasma disperso com um núcleo indistinto, situado na periferia. A diferenciação do zigoto progride com a formação de um cineto, a partir da invaginação do citoplasma celular em um dos lados do parasito. Cinetos indiferenciados são inicialmente observados cinco dias após a infestação, e são caracterizados por um citoplasma homogêneo e um núcleo redondo situado no polo anterior; enquanto cinetos diferenciados apresentam um “cap” polar na extremidade anterior, citoplasma vacuolizado e núcleo frequentemente situado numa posição mais central. Do quinto ao sétimo dia após a infestação, isto é, um dia antes do ingurgitamento até a repleção das ninfas, cinetos diferenciados podem ser vistos na hemolinfa das ninfas. Uma primeira fase de esporogonia de *B. equi*, acontece na glândula salivar de ninfas de *Hyalomma*, antes dos carrapatos mudarem para adultos (ZAPF & SCHEIN, 1994b).

2.3. Aspectos da transmissão da *Babesia canis* pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

LOUNSBURY (1901, 1904), citado por WENYON (1926), foi o primeiro a demonstrar experimentalmente, na África do Sul, que a *B. canis* é transmitida por carrapatos, no caso o *H. leachi*. Esse autor demonstrou que carrapatos adultos

alimentados em cães infectados tiveram sua geração subsequente infectada. As larvas e ninfas não foram capazes de transmitir a infecção, porém, os adultos sim.

CHRISTOPHERS (1907) também observou a ocorrência de transmissão transovariana de *B. canis* no *R. sanguineus*. No seu trabalho tanto ninfas quanto adultos foram capazes de transmitir este protozoário ao cão.

SHORTT (1936) conseguiu a transmissão de *B. canis* tanto por larvas quanto por ninfas e adultos de *R. sanguineus*. O autor confirmou a existência de transmissão estágio a estágio, isto é, o carrapato que se infecta como larva, transmite a infecção como ninfa e quando infectado como ninfa, transmite o protozoário como adulto.

REICHENOW (1935) observou que todos os três estágios de *R. sanguineus* podem transmitir *B. canis*, porém, os adultos tanto machos quanto fêmeas, seriam transmissores mais eficientes, enquanto as larvas só transmitiriam quando usadas em grande número.

A ocorrência de infecção vertical (transovariana) foi confirmada por BRUMPT (1937) que conseguiu manter a infecção de *R. sanguineus*, mesmo quando alimentados por cinco gerações em hospedeiros não susceptíveis a *B. canis*.

SHORTT (1973) obteve sucesso na transmissão de *B. canis* pelos três estágios do carrapato (larvas, ninfas e adultos) tanto de *R. sanguineus* quanto de *H. leachi*. O autor ressaltou, entretanto, que a temperatura de manutenção das fases não

parasitárias dos carrapatos pode influenciar negativamente a transmissão de *B. canis*, considerando a temperatura de 28 °C como sendo muito elevada para o desenvolvimento deste protozoário nos carrapatos.

FRIEDHOFF & SMITH (1981) consideram que como ainda não foram utilizadas cepas de carrapatos comprovadamente negativas para *B. canis*, ainda não se sabe quais os estágios que adquirem a infecção. Entretanto, sugerem que a fêmea seria o único estágio susceptível, a exemplo do que ocorre para outras espécies de carrapatos e de *Babesia* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do experimento

O experimento foi realizado nos laboratórios da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3.2. Estudo da *Babesia canis* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado

3.2.1. Obtenção e manutenção dos animais

Foram utilizados cinco cães (*Canis familiaris* L.) sem raça definida, sendo três fêmeas e dois machos com idades variando de 6 meses a 2 anos no momento da

exposição aos carrapatos. Todos os animais procederam de locais adjacentes à UFRRJ, com paternidade ignorada, porém, criados desde jovens sob condições controladas em laboratório. Três dentre os animais citados foram esplenectomizados antes do início do experimento.

Os animais foram mantidos em boxes individuais. Todos foram vermifugados e vacinados contra cinomose, parvovirose, leptospirose, hepatite, parainfluenza canina e raiva, recebendo alimentação a base de ração balanceada e água a vontade. O cão doador foi identificado na área rural do Município de Seropédica, sendo caracterizado como naturalmente infectado por *B. canis* através de esfregaços sangüíneos corados pelo método de Giemsa.

3.2.2. Obtenção da amostra de *Rhipicephalus sanguineus*

Foram utilizados inicialmente, carrapatos adultos identificados como *R. sanguineus* por RIBEIRO (1995), provenientes de uma colônia de carrapatos mantida sob rígido controle biológico em coelhos brancos por dez gerações sucessivas. Essa colônia pertence ao laboratório de Ixodologia situado na EPPWON da UFRRJ. Vinte e sete fêmeas ingurgitadas tiveram suas hemolinfas examinadas no 10º dia após o desprendimento das orelhas dos coelhos infestados para comprovação da negatividade de *B. canis* nestas fêmeas. Só então sua progênie foi usada neste experimento.

3.2.3. Manutenção de *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos e cães: metodologia de infestação

Durante todo o período experimental, a colônia de *R. sanguineus* foi mantida em coelhos. A técnica utilizada para infestação dos coelhos foi a preconizada por NEITZ *et alii* (1971). Para a infestação dos cães, fez-se uma pequena adaptação do modelo utilizado em bovinos (SARTOR, 1994).

3.2.4. Obtenção de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* positivos para *Babesia canis*, em condições laboratoriais

Inicialmente, dois cães esplenectomizados (cães n° 1 e n° 2) foram inoculados via intravenosa com 2 ml de sangue comprovadamente positivo para *B. canis*. No início da parasitemia, cada um deles foi infestado com 20 machos, 20 fêmeas, 200 ninfas e aproximadamente 5000 larvas de *R. sanguineus*. Concomitantemente, um terceiro animal (cão n° 3) também esplenectomizado foi infestado com o mesmo número de carrapatos. Este cão foi acompanhado diariamente por dois meses após a cirurgia para investigação da ocorrência de *B. canis*, sendo incluído no experimento como controle negativo. Os demais animais do experimento foram examinados diariamente a partir da inoculação de *B. canis*.

Um quarto animal (cão n° 4) não esplenectomizado recebeu sangue positivo para *B. canis* proveniente dos cães n° 1 e n° 2. Após apresentar parasitemia, esse animal foi infestado com 25 machos e 25 fêmeas de *R. sanguineus*, além da mesma quantidade de larvas e ninfas utilizadas nas infestações anteriores.

Aproximadamente dois meses depois da primeira infestação, o cão n° 2, que ainda apresentava *B. canis* circulante, foi reinfestado, desta vez com 70 machos e 70 fêmeas de *R. sanguineus*.

Em uma quarta etapa, o cão n° 1 (controle negativo no início do trabalho) e outro cão (n° 5) não esplenectomizado, foram inoculados com sangue de animais portadores de *B. canis*. Os dois animais inoculados apresentaram parasitemia e foram infestados com 25 machos e 25 fêmeas de *R. sanguineus* livres da infecção.

Todos os animais assim infestados foram examinados, diariamente, com avaliação da temperatura retal e confecção de esfregaços sangüíneos para pesquisa de hemoparasitos. Os esfregaços sangüíneos foram preparados utilizando-se sempre a primeira gota de sangue obtida após a punção de pequenos vasos do pavilhão auricular. Todos os esfregaços foram secos ao ar, fixados em metanol por três a cinco minutos e posteriormente corados pelo corante de Giemsa, com solução a 10% por 40 minutos. Após a coloração, os esfregaços foram lavados em água corrente secos ao ar e examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x, ocular de 10x, com auxílio de óleo de imersão.

Após as infestações com *R. sanguineus* foram feitas observações diárias. As fêmeas que se desprenderam foram pesadas, acondicionadas individualmente em placas de Petri e mantidas em estufa incubadora para B.O.D. à temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa superior a 80% e escotofase. As larvas que se desprenderam foram separadas em grupos de 100 e acondicionadas em seringas plásticas especialmente preparadas para conter os carrapatos. As ninfas ingurgitadas foram contadas e separadas em grupos de 20 e, também, colocadas em seringas plásticas. Tanto larvas quanto ninfas foram mantidas sob as mesmas constantes que as fêmeas.

3.2.5. Estudo das fases evolutivas de *Babesia canis* nas fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*

A partir do 1º dia até 15º dia após o desprendimento, a hemolinfa e os diferentes órgãos das fêmeas de *R. sanguineus* foram examinados microscopicamente para verificação da infecção por *B. canis*.

A. Exame da hemolinfa

Todas as fêmeas de *R. sanguineus* tiveram suas hemolinfas examinadas para pesquisa de esporocinetos de *B. canis*. Os esfregaços de hemolinfa foram

preparados a partir da secção da região distal de uma ou mais patas das fêmeas, com o auxílio de uma tesoura de ponta fina. Todas as amostras foram depositadas em lâminas de vidro para microscopia, secas ao ar, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa. Após coloração, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico, utilizando objetivas de 10x, 40x e 100x e ocular de 10x.

B. Exame dos órgãos internos

Para extração dos órgãos internos foram utilizados tesoura de ponta fina, alfinetes e pinças entomológicas, sob microscópio estereoscópico.

As fêmeas vivas foram depositadas em decúbito ventral em uma placa de Petri (100 x 200 mm), contendo no seu interior uma camada de 1,5 cm de parafina sólida. Em seguida foram imobilizadas com o auxílio de alfinete entomológico, transfixando a região entre o escudo e a base do gnatosoma. Com a tesoura foi feita uma incisão no sulco marginal, contornando totalmente o idiosoma. O tegumento dorsal foi rebatido, expondo a cavidade geral. Essa foi banhada com solução salina fria ($\pm 6^{\circ} \text{C}$) para aumentar a consistência dos órgãos a serem coletados.

Foram coletadas amostras de intestino e ovário. Os fragmentos dos órgãos foram coletados separadamente, lavados em solução salina para remoção de parte do conteúdo intestinal e limpeza dos fragmentos; e depositados em lâminas de vidro

previamente identificadas, onde imediatamente após, confeccionou-se os esfregaços. Estes foram secos ao ar, fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa.

C. Exame de ovos

Amostras de ovos provenientes das fêmeas de *R. sanguineus mantidas* em B.O.D. foram coletadas e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições dos adultos. A coleta e processamento das amostras foram realizadas durante o período de incubação, a intervalos de 24 horas.

Seis a dez ovos foram separados e alinhados em uma lâmina de vidro apropriada. Utilizando outra lâmina igual a descrita anteriormente, pressionou-se os ovos, esmagando-os e deslizando-se uma lâmina sobre a outra. Um ligeiro movimento de distensão foi assim realizado, obtendo de uma só vez, duas lâminas com esfregaços dos ovos. Estas lâminas foram processadas da mesma forma que as lâminas contendo os esfregaços de órgãos.

3.2.6. Estudo das fases evolutivas de *Babesia canis* nas larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*

Cerca de quinze larvas foram separadas diariamente e alinhadas de cinco em

cinco sobre uma lâmina de vidro. Utilizando uma outra lâmina, pressionou-se e esmagou-se os carrapatos, obtendo assim duas lâminas com macerados de larvas ingurgitadas. Quanto às ninfas, cinco delas eram separadas diariamente e postas individualmente sobre uma lâmina para confecção dos macerados. O mesmo procedimento foi realizado por sete dias tanto para larvas quanto para ninfas.

Todos os macerados, após secarem ao ar, foram fixados em metanol e corados pelo Giemsa.

3.2.7. Estudos morfométricos das formas evolutivas de *Babesia canis* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e no hospedeiro vertebrado

Para os estudos morfométricos no hospedeiro vertebrado, foram confeccionados esfregaços de sangue periférico, processados pelo método de Giemsa conforme descrito anteriormente.

A partir do hospedeiro invertebrado foram confeccionados esfregaços de hemolinfa, macerados de intestino e ovário das fêmeas e, também, amostras de ovos, todos com diferentes dias de incubação. Todo o material foi fixado em metanol e corado pelo Giemsa.

Os aspectos morfométricos das formas de *B. canis* foram estudados em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão. As medidas foram tomadas com

ocular micrométrica (aus JENA - produzido na RFA).

As fotomicrografias foram realizadas com microscópio óptico (Leitz Dialuz 20 EB), acoplado à câmara fotográfica (Wild photoautomat MPS 55). O tempo de exposição foi medido com fotômetro automático.

3.3. Transmissão da *Babesia canis* por *Rhipicephalus sanguineus*

3.3.1. Obtenção de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*, positivos para *Babesia canis*

Os cães n° 1, n° 2 e n° 4, que foram utilizados no experimento de biologia da *B. canis* concomitantemente à infestação com adultos, receberam aproximadamente 5000 larvas e 200 ninfas de *R. sanguineus*, obtidas da colônia de carrapatos mantida em coelhos. Após o desprendimento dos três instares, alguns exemplares foram separados, mantidos em B.O.D., à temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa superior a 80% e escotofase.

Após ecdise, ninfas e adultos foram utilizados para os ensaios de transmissão. Do mesmo modo, alguns ovos provenientes de fêmeas comprovadamente positivas para *B. canis* foram mantidos nas mesmas condições dos demais instares, para completarem seu desenvolvimento. Após eclosão das larvas, essas também foram utilizadas para tentativa de transmissão do protozoário ao seu hospedeiro vertebrado.

3.3.2. Infestação dos cães

Nesta fase do experimento foram utilizados quatro cães jovens, entre 60 e 90 dias, sem raça definida, procedentes de Seropédica que após inúmeros exames não apresentaram *Babesia* nos esfregaços sanguíneos. Estes animais não estavam infestados com carrapatos no momento da sua aquisição. Desses animais, dois foram infestados com aproximadamente 5000 larvas de *R. sanguineus*, cada um. O terceiro animal recebeu 200 ninfas e o quarto, 50 machos e 50 fêmeas.

As técnicas de infestação desses cães com carrapatos e a de avaliação da infecção nos animais estudados foram as mesmas anteriormente citadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos morfológicos da *Babesia canis* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

Nas primeiras 24 horas após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, foram observadas no intestino do carrapato, formas intraeritrocíticas de *B. canis* tanto piriformes quanto arredondadas, semelhantes às encontradas no sangue periférico dos cães (Figura 1A). Segundo MELHORN *et alii* (1980), os estágios piriformes são lisados e somente os estágios ovais do parasito continuarão o seu desenvolvimento no vetor. Pequenas formas em anel com citoplasma avermelhado e núcleo marginal foram observadas no conteúdo intestinal (Figura 1B). Essas formas são semelhantes às formas encontradas no interior dos eritrócitos dos cães e de acordo com MELHORN *et alii* (1980), representam gametócitos de *B. canis*. Estes parasitos aumentaram de tamanho atingindo entre

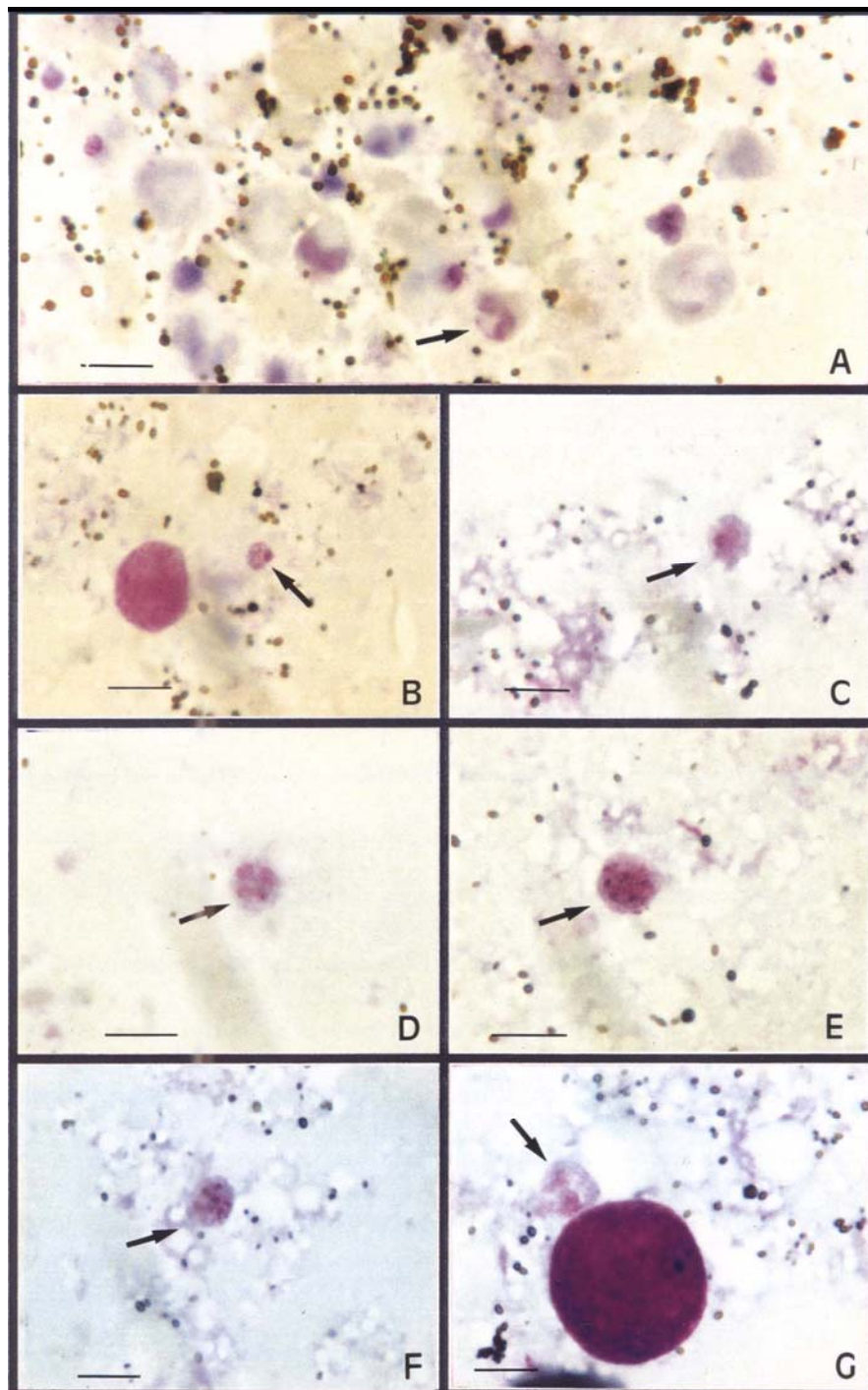


FIGURA 1. Formas evolutivas de *Babesia canis* no intestino de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, com até 24 horas de desprendimento. Giemsa (— = 10 μ m). **A.** Forma intraeritrocítica na luz intestinal. **B.** Forma gametocítica na luz intestinal. **C, D, E, F.** Gamontes na luz intestinal. **G.** Oocineto em formação.

5,6 - 6,2 μm até 7,6 μm (Figura 1C), ao mesmo tempo em que iniciaram divisão nuclear. Foram encontrados parasitos com dois, quatro ou mais núcleos (Figura 1D, E, F). ZAPF & SHEIN (1994a) consideraram, em relação à *B. equi*, todos estes estágios multinucleados como sendo microgamontes anteriores a formação dos microgametas. Ainda neste período de 24 horas após o ingurgitamento, foram observadas formas piriformes contendo dois núcleos e medindo 6,3 x 8,7 μm , possivelmente um zigoto em formação (Figura 1G).

Entre o 10º e o 11º dia após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas, ainda foram observados eritrócitos não parasitados intactos, dentro do conteúdo intestinal. Foram observados parasitos arredondados com o citoplasma azulado, contendo o núcleo na maioria das vezes em posição central e podendo, porém, estar deslocado para a margem do parasito (Figura 2A). Esses estágios encontravam-se freqüentemente em grupos (Figura 2B) e são semelhantes aos que MEHLHORN *et alii* (1980) e ZAPF & SHEIN (1994a) descreveram como macrogametas. Os estágios raiados — considerados como microgamontes, descritos pela primeira vez por KOCH (1906) para *B. bigemina* e posteriormente observado por outros autores para diferentes espécies, incluindo *B. canis* (SHORTT, 1973; MELHORN *et alii*, 1980) — não foram observados no presente estudo. Entretanto, foram descritos estágios semelhantes aos considerados por ZAPF & SHEIN (1994a) como grupos de macrogametas fertilizados (Figura 2C, D). Fusão de gametas não foi identificada,

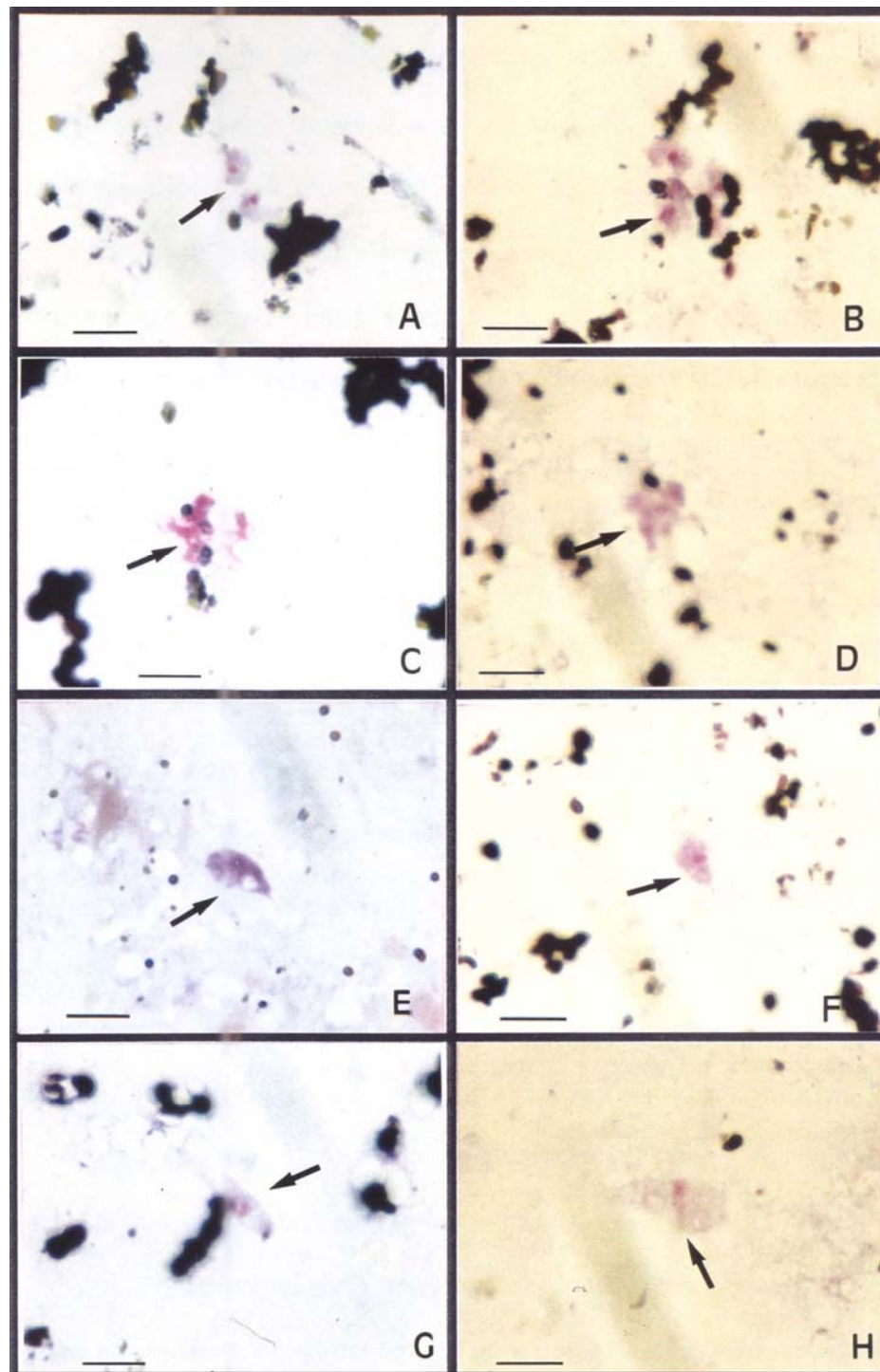


FIGURA 2. Formas evolutivas de *Babesia canis* no intestino de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, a partir do 10º dia do desprendimento. Giemsa (— = 10 µm). **A e B.** Macrogametas na luz intestinal. **C e D.** Macrogametas fertilizados na luz intestinal. **E e F.** Formas imaturas de oocineto. **G e H.** Forma madura de oocineto.

contudo, a partir do 10º dia de incubação, zigotos (oocinetos) móveis foram observados no conteúdo intestinal, sendo os estágios imaturos menores com o núcleo arredondado localizado centralmente e o citoplasma azulado e uniforme (Figura 2E, F). Cinetos idênticos aos encontrados na hemolinfa dos carrapatos também foram observados no conteúdo intestinal (Figura 2G). Provavelmente estes atravessam a parede intestinal e atingem a hemolinfa (SHORTT, 1973; MEHLHORN *et alii*, 1980). Alguns oocinetos maiores e com o citoplasma bastante vacuolizado foram encontrados e talvez representem um estágio final do parasito, iniciando um processo de degeneração (Figura 2H).

Na hemolinfa, os primeiros esporocinetos foram observados somente a partir do 10º dia de incubação das fêmeas ingurgitadas. Este período foi bastante superior ao descrito por BARREIRA (1988) para *B. bigemina* e *B. bovis*, cujo tempo de aparecimento dos esporocinetos na hemolinfa foi de três dias. SHOUT (1973) encontrou o tempo de incubação de seis dias para a primeira detecção de cinetos de *B. canis* na hemolinfa de *R. sanguineus*, enquanto HIGUCHI *et alit* (1991) observaram um período de dez dias para *B. gibsoni* no carrapato *H. leachi*. As variações de tempo observadas em relação ao aparecimento dos esporocinetos na hemolinfa, estão muito provavelmente relacionadas com as diferenças entre as amostras de *B. canis* e de *R. sanguineus* utilizadas.

Os cinetos imaturos apresentavam-se com forma vermicular, possuindo

núcleo arredondado, corado fortemente de vermelho e localizado principalmente na região mediana do parasito, podendo, entretanto, ser encontrado nas regiões anterior e posterior. O citoplasma nestes estágios imaturos é denso e uniforme, corando-se de azul em toda sua extensão (Figura 3A, B, E, F). Alguns parasitos apresentavam uma massa de cromatina corada de vermelho na extremidade anterior do parasito ("cape") (Figura 3C, D); esse, entretanto, não foi um achado constante. Com o envelhecimento dos cintos, o citoplasma começa a apresentar vacúolos que vão aumentando de número e tamanho, assim como uma redução da massa de cromatina até o seu completo desaparecimento (Figuras 3G, H). Essa evolução se assemelha ao que foi descrito por RIEK (1964, 1966) e BARREIRA (1988) para *B. bigemina* e *B. bovis*. Os cintos na hemolinfa variaram de 1,8-3,7 μm no seu diâmetro menor e 9,0-16,4 μm no seu diâmetro maior, com uma média de 2,9 μm (desvio padrão (a) = 3,88) x 13,6 μm (a = 1,87). Estas mensurações são semelhantes às encontradas por SHORTT (1973) para *B. canis* e por HIGUCHI *et alii* (1991) para *B. gibsoni*.

Infecção ovariana foi observada a partir do 10º dia de desprendimento das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Neste período foram observados parasitos arredondados, com citoplasma azulado e núcleo vermelho, de um modo geral, localizado na margem do parasito (Figura 4A). Algumas vezes o núcleo pode estar em processo de expansão e o citoplasma pode estar vacuolizado. Formas arredondadas grandes com vários fragmentos nucleares também foram observadas e

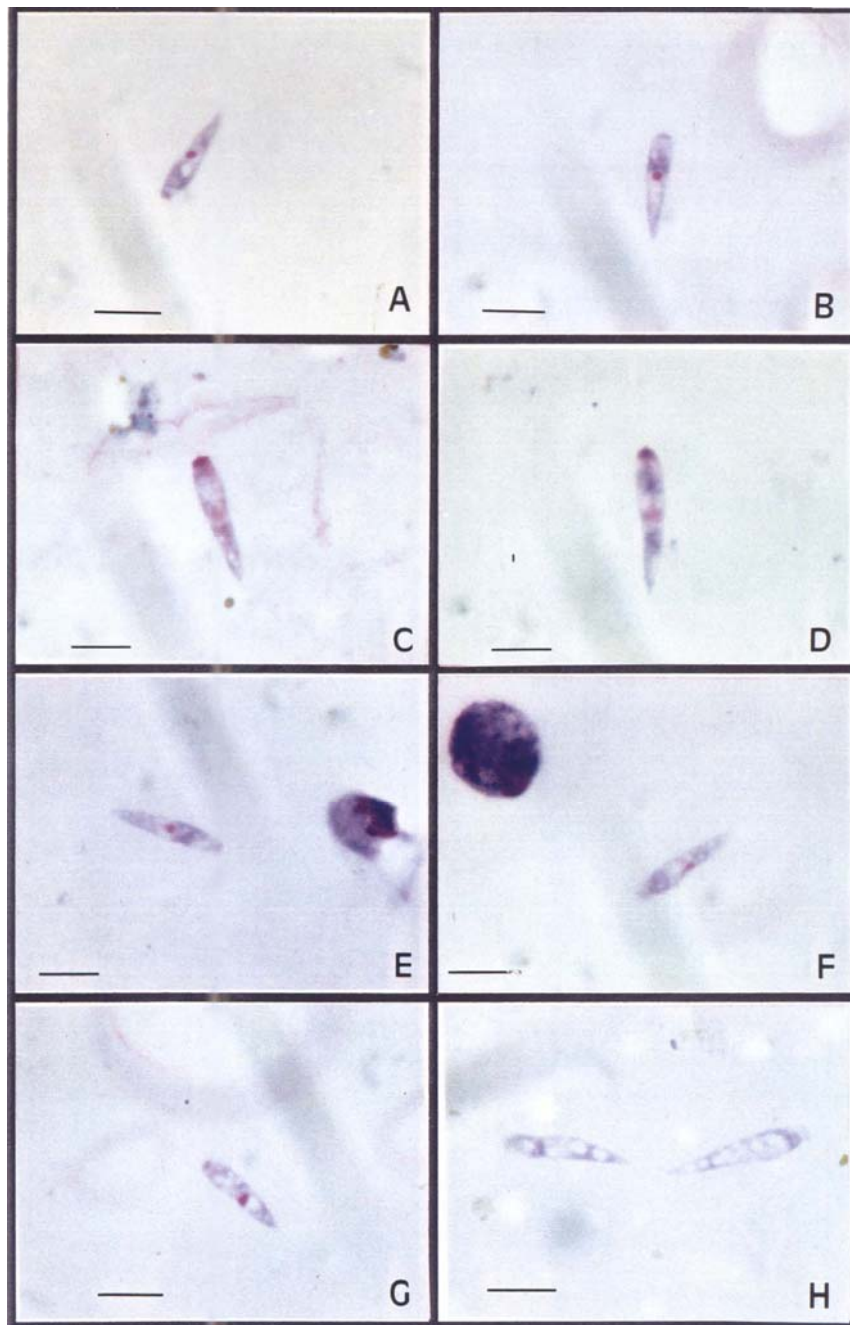


FIGURA 3. A, B, C, D, E, F, G e H. Esporocinetos de *Babesia canis* na hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Giemsa (— = 10 μm).

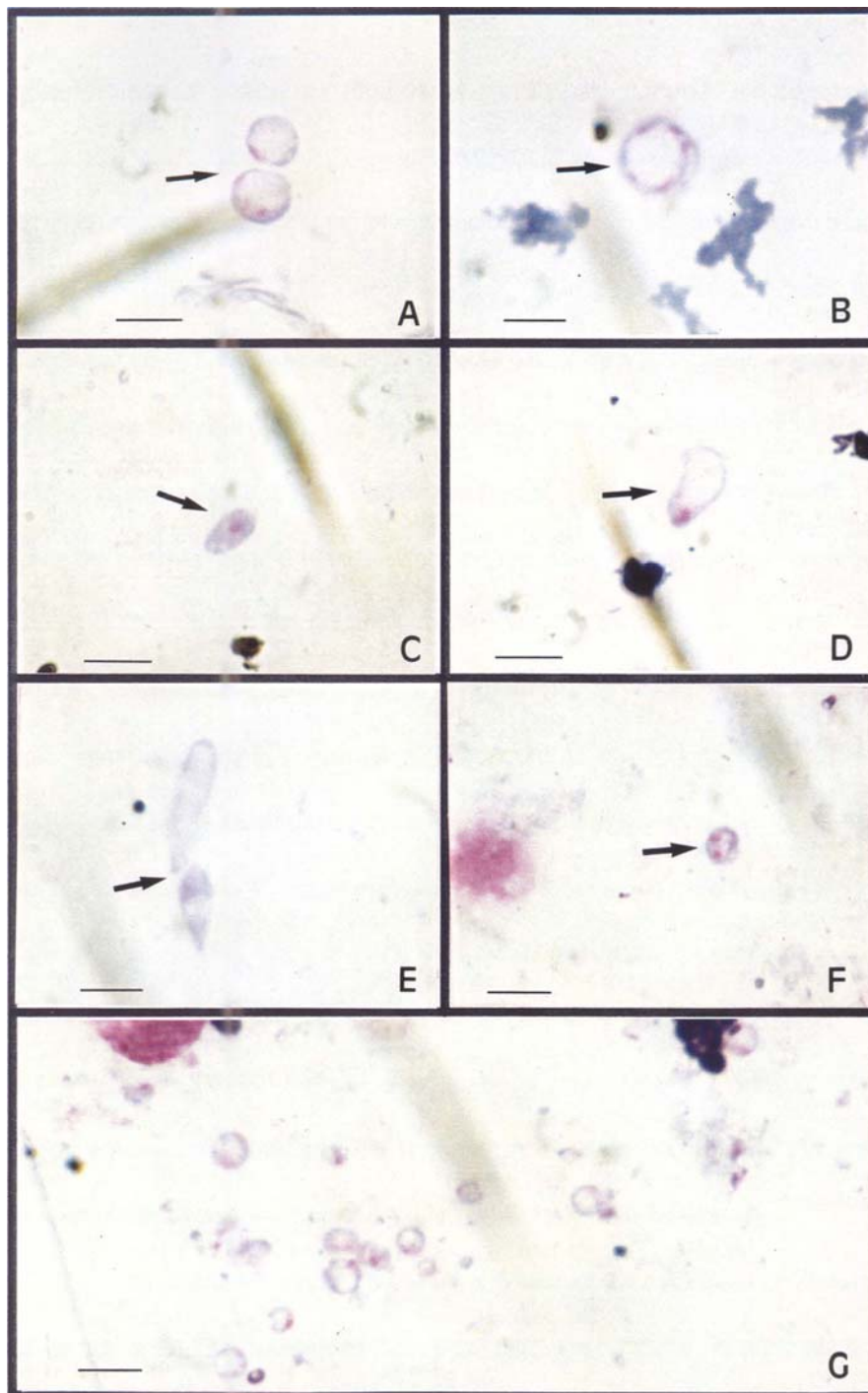


FIGURA 4. Formas evolutivas de *Babesia canis* no ovário e ovos de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Giemsa (— = 10 μ m). **A.** Esporocineto oval no ovário. **B.** Esporocineto com núcleo em divisão no ovário. **C e D.** Esporocinetos em formação no ovário **E.** Esporocineto maduro no ovário. **F.** Esporocineto em divisão nos ovos **G.** Esporocinetos arredondados nos ovos.

representam divisão nuclear para posterior formação de novos parasitos (Figura 4B). Neste período já podem ser observados parasitos claviformes em formação, com núcleo vermelho central e citoplasma azulado (Figura 4C, D). As formas ovaladas variaram muito de tamanho, com os parasitos menores medindo 2,88 μm x 3,24 μm , os maiores chegando a 6,48 μm x 7,20 μm , e uma média de 4,82 μm ($\sigma = 1,25$) x 6,05 μm ($\sigma = 1,45$). Apesar de predominarem as formas ovaladas alguns parasitos apresentavam formas bizarras, possivelmente representando a formação de um cineto. A partir do 11° ao 15° dia de incubação, predominaram as formas vermiculares do parasito com núcleo central, região anterior abaulada e posterior mais afilada (Figura 4E). Estes cinetos também variaram de tamanho, com o diâmetro menor variando de 2,34 - 4,58 μm , o diâmetro maior variando de 8,37 - 15,66 μm e com uma média de 3,87 μm ($\sigma = 0,91$) x 12,23 μm ($\sigma = 2,16$). RIEK (1964) e BARREIRA (1988) encontraram *B. bigemina* e *B. bovis* parasitando o ovário de *B. microplus* a partir do 4° dia de incubação. Porém, para esta espécie predominaram as formas vermiculares. SHORTT (1936) observou formas de *B. canis* no ovário de *R. sanguineus*, encontrando parasitos ovais de tamanhos variáveis e medindo cerca de 1,4 - 2,0 μm até 5,0 - 6,0 μm , sendo, portanto, menores do que as formas encontradas no presente estudo. Contudo, as formas vermiculares encontradas por esse autor atingiram até 13 μm de comprimento, sendo semelhantes às nossas.

O exame de macerados de ovos provenientes de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas em cães infectados demonstrou *B. canis* a partir do nono até o 22º dia após a postura. Foram observadas formas arredondadas do parasito, semelhantes àquelas do ovário, com núcleo vermelho, marginal na maioria das vezes e citoplasma azulado. Alguns indivíduos estavam em processo de divisão binária, apresentando duas massas de cromatina distintas (Figura 4F). Seu tamanho variou de 2,25 - 6,21 μm x 2,61 - 7,20 μm com média de 3,55 μm ($\sigma = 0,86$) x 4,18 μm ($\sigma = 0,93$), portanto, menores do que os estágios ovais encontrados no ovário. Estes parasito arredondados algumas vezes estavam isolados, mas na maioria das vezes encontravam-se em grupos (Figura 4G). A ocorrência de estágios de *B. canis* nos ovos de *R. sanguineus* também foi descrita por SHORTT (1936, 1973). Entretanto, em 1973, este autor encontrou ovos infectados a partir de 24 horas até 18 dias após a postura. Essa grande diferença entre o tempo de aparecimento da infecção observada no nosso experimento e o que foi descrito por SHORTT (1973) pode ser devido à baixa infectividade da amostra de ovos, fazendo com que o pequeno número de parasitos levasse mais tempo até que atingisse uma quantidade suficientemente capaz de ser detectada nos esfregaços. Um outro fator que reforça essa hipótese da baixa infectividade da *B. canis* é o pequeno número de ovos positivos. SHORTT (1973) citou a predominância de formas ovaladas de *B. canis* nos ovos de *R. sanguineus*, porém, o autor encontrou alguns parasitos alongados. As formas

claviformes descritas por CHRISTOPHERS (1907) e SHORTT (1936) não foram freqüentemente encontradas por SHORTT (1973), assim como não foram observadas neste experimento. É interessante notar que para *B. bigemina* e *B. bovis* as formas predominantes nos ovos são as claviformes, demonstrando uma diferença marcante em relação à *B. canis* (RIEK, 1964,1966; BARREIRA, 1988).

O exame de larvas ingurgitadas em cães infectados com *B. canis*, demonstrou positividade a partir do 4º dia após o desprendimento. A parasitemia nas larvas ingurgitadas foi bastante baixa, o que está de acordo com os achados de SHORTT (1973) que citou a baixa parasitemia devido à massiva destruição dos parasitos no trato intestinal dos carrapatos. No presente trabalho foram encontradas formas arredondadas, com citoplasma azul claro e núcleo arredondado na periferia (Figura 5A). Esse achado corresponde ao citado por SHORTT (1973) para o mesmo período, sendo que o autor encontrou larvas infectadas a partir do primeiro dia após o desprendimento; encontrando, também, além dos parasitos ovais, algumas formas vermiculares e formas com o núcleo em divisão.

Em relação às ninfas, essas encontraram-se positivas a partir do 5º dia após o ingurgitamento. Nessas, além de formas ovais com citoplasma azulado e núcleo vermelho localizado na margem do parasito (Figura 5B), foram encontrados parasitos arredondados e grandes, contendo vários núcleos (Figura 5C, D). Outro estágio observado foi em forma de clava, com citoplasma azulado e diversos

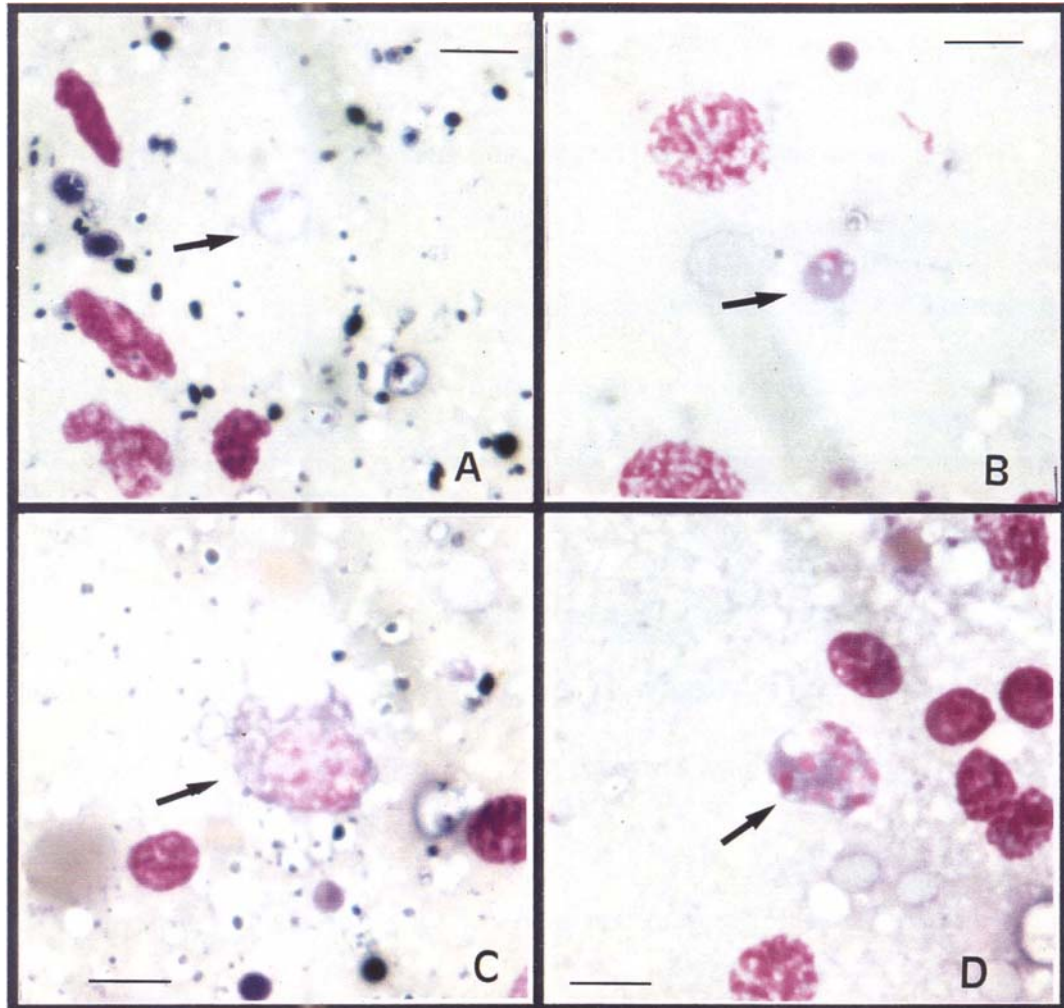


FIGURA 5. Formas evolutivas de *Babesia canis* em macerados de larva e ninfa de *Rhipicephalus sanguineus*. Giemsa (— = 10 μ m).
A. Esporocineto no corpo da larva.
B. Esporocineto no corpo da ninfa.
C. Forma com o núcleo em expansão no corpo da ninfa.
D. Forma com diversos núcleos no corpo da ninfa.

fragmentos nucleares na região mais abaulada do seu corpo. Essas formas multinucleadas provavelmente correspondem ao que SHORTT (1936, 1973) denominou de pseudocisto. O autor também observou formas ovais que após crescimento celular e divisão nuclear, originaram os pseudocistos. Estes deram origem a diversos estágios claviformes que, entretanto, não foram observados neste experimento.

4.2. Transmissão da *Babesia canis* por *Rhipicephalus sanguineus*

Os dois cães infestados com aproximadamente 5000 larvas de *R. sanguineus* provenientes de fêmeas infectadas permaneceram negativos para *B. canis* após 30 dias de exames diários de seus esfregaços sanguíneos. Considerou-se, então, que as larvas não transmitiram *B. canis*.

O animal que foi infestado com 200 ninfas, apresentou *B. canis* na circulação nove dias após a infestação com os carrapatos. O cão infestado com 50 machos e 50 fêmeas mostrou-se positivo seis dias após os carrapatos terem sido colocados.

A não transmissão da *B. canis* por larvas de *R. sanguineus* pode ter ocorrido devido ao número de larvas, já que, segundo REICHENOW (1935), as larvas só transmitem a infecção quando estão em grande número. Um outro fator que pode ter prejudicado a transmissão é a temperatura de manutenção (27 ± 1 °C) que foi considerada elevada por SHORTT (1973) para o completo desenvolvimento da *B. canis* no carrapato.

Entretanto, deve-se levar em conta também a virulência da cepa de *B. canis* para a colônia de carrapatos utilizada, pois como foi observado por SMITH *et alii* (1978) para *B. bovis* no *B. microplus*, a taxa de infecção das larvas é proporcional à taxa de infecção das fêmeas. Assim sendo, o número de larvas infectadas pode ter sido insuficiente para transmitir a infecção para os cães.

O período de incubação entre a infestação com ninfas até o aparecimento de *B. canis* nos esfregaços foi superior ao observado por PARAENSE (1949) que encontrou um período de incubação de seis dias e ao encontrado por SHORTT (1973) que foi de cinco dias. Todavia, em relação ao período de incubação quando o cão foi infestado com adultos de *R. sanguineus*, este foi idêntico ao de PARAENSE (1949) e bastante inferior ao de SHORTT (1973) que, para *H. leachi*, foi de dez dias e, para adultos de *R. sanguineus*, foi de 21 dias. Essa diferença no período de incubação pode ocorrer devido à virulência da amostra de *B. canis* ou à taxa de infecção dos carrapatos utilizados.

4.3. Observações de hemoparasitos no hospedeiro vertebrado

Esfregaços sanguíneos dos cães inoculados com *B. canis* foram realizados diariamente a partir do dia da inoculação. O tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento de *B. canis* variou de dois a quatro dias. Estes resultados são similares aos encontrados por PARAENSE (1949), EWING (1965) e SHORTT (1973).

Os trofozoítos de *B. canis* mostraram-se bastante pleomórficos, com a presença de formas anelares (Figura 6A), piriformes (Figura 6B), amebóides e formas bizarras (Figura 6C). Segundo RUDZINSKA *et alii* (1979) e MELHORN *et alii* (1980), os parasitos arredondados podem ser gametócitos, que no carrapato continuarão o ciclo. À luz da microscopia óptica não é possível definir a natureza dos corpos arredondados. Raramente foram observadas hemácias com oito ou mais trofozoítas (Figura 6D), ao contrário do que foi citado por EWING (1965), provavelmente em função de termos trabalhado com cães mestiços, e portanto, com maior resistência imunológica. Também foram encontrados com frequência parasitos livres no plasma, assim como fagocitados no interior de macrófagos, demonstrando acentuada atividade de defesa.

As mensurações das formas piriformes pareadas variaram de 1,80 μm a 2,61 μm de largura por 2,52 μm a 5,22 μm de comprimento, com uma média de 2,40 μm ($\sigma = 0,38$) x 3,90 μm ($a = 0,65$). Estes valores são semelhantes aos encontrados por PURNELL (1981) que citou as formas piriformes variando de 2,5-3,0 μm x 5,0 μm .

Após inoculação de sangue infectado, o cão n° 3 além de *B. canis* apresentou-se positivo para *Haemobartonella canis* (Figura 7A). Foram observadas principalmente formas cocóides, cujo diâmetro variou de 0,3 a 0,7 μm , com média de 0,4 μm ($\sigma = 0,13$), e formas em anel que variaram de 0,5 a 0,8 μm , com média de

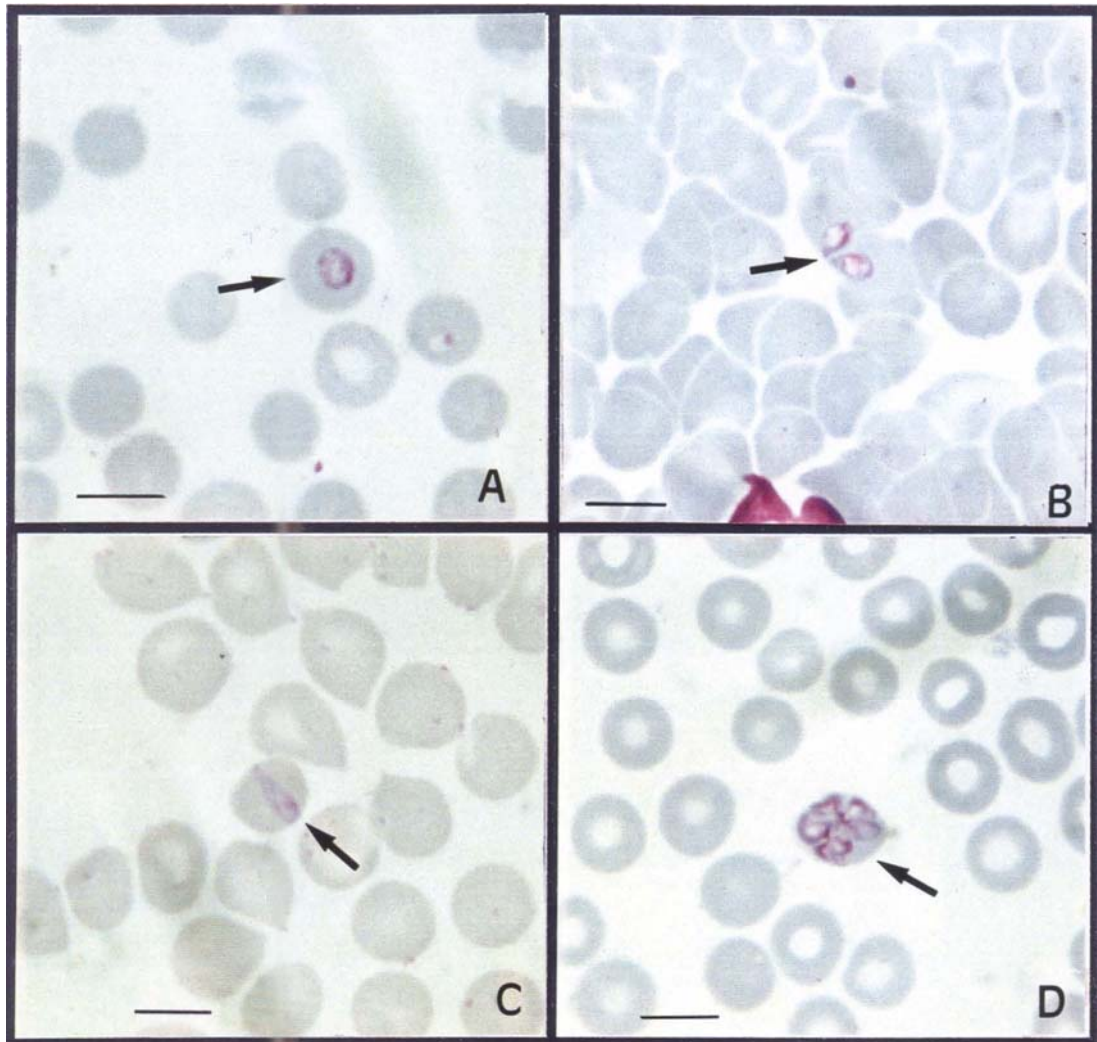


FIGURA 6. Formas intra-eritrocíticas de *Babesia canis* coradas pelo método de Giemsa (— = 10 μ m).
A. Forma anelar.
B. Forma bigeminada.
C. Forma alongada em faixa.
D. Forma trofozoítica em multiplicação.

0,6 μm ($\sigma = 0,1$). As formas cocóides frequentemente se agruparam formando cadeias na superfície dos eritrócitos. A morfologia das formas sangüíneas de *Haemobartonella canis* foi semelhante à descrita por NEITZ (1939) e WRIGHT (1971), sendo que este último citou as formas cocóides como medindo de 0,2-0,5 μm de diâmetro e as formas em anel medindo de 0,4-0,8 μm de diâmetro. SOMODA *et alii* (1978) encontraram *H. canis* medindo de 0,2 a 0,6 μm de diâmetro.

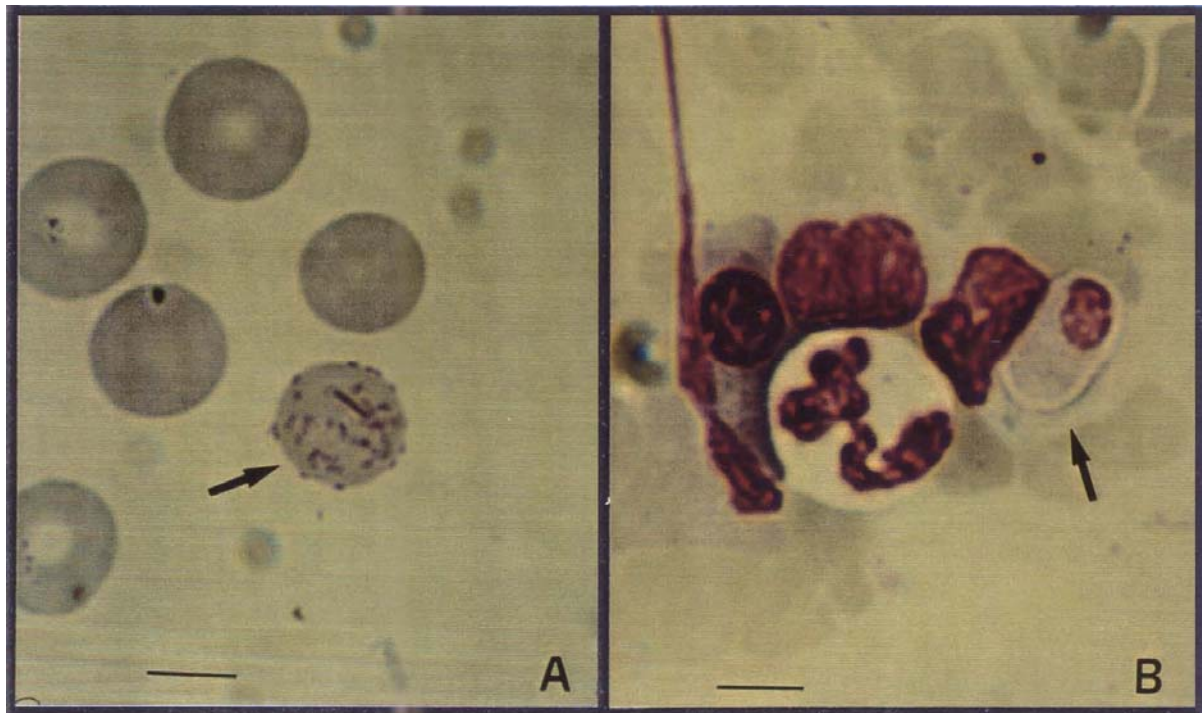


FIGURA 7. A. Formas eritrocitárias de *Haemobartonella canis*. Giemsa (— = 10 μm).
B. Forma gametocítica, intraleucocitária de *Hepatozoon canis*. Giemsa (— = 10 μm).

Esse mesmo animal, antes da inoculação de *B. canis*, era portador de *Hepatozoon canis*, cujos gametócitos apareciam na circulação esporadicamente (Figura 7B). O *Hepatozoon canis* voltou a aparecer na circulação onze dias após a inoculação, tornando-se periódico a partir desta data. Os gametócitos encontrados mediram de 4,32 a 5,85 μm ($\bar{X} = 5,11$; $\sigma = 0,57$) x 8,82 a 11,52 μm ($\bar{X} = 9,56$; $\sigma = 1,13$), valores estes superiores aos encontrados por GONDIM *et alii* (1994), cujos gametócitos variaram de 6,83 x 4,0 μm a 7,5 x 4,5 μm , porém, semelhantes aos encontrados por MASSARD (1979), cujos gametócitos variaram de 8,4 - 12,0 μm x 4,8 - 8,4 μm .

NEITZ (1939) relatou o aparecimento de *Haemobartonella canis* em um cão não esplenectomizado, positivo para *Ehrlichia canis*, *B. canis* e *Hepatozoon canis*. WRIGHT (1971) observou a existência de *Haemobartonella canis* associada à *B. canis* em um cão esplenectomizado.

O animal apresentou *Hepatozoon canis* pela primeira vez após a esplenectomia e, só após a inoculação de *B. canis*, é que foi identificada a *Haemobartonella canis*; tornando-se, portanto, portador das três hemoparasitoses simultaneamente. A origem do parasitismo por *Haemobartonella canis* não foi identificada, já que o animal doador do sangue não mostrou essa rickettsia nos esfregaços sangüíneos. Assim, o cão n° 3 já poderia ser portador da *Haemobartonella canis*, como já o era para *Hepatozoon canis*; e, com a queda da

resistência devido aos outros hemoparasitos, esta foi reativada; ou, então, o animal doador poderia ser portador assintomático, infectando o cão nº 3 após a inoculação.

5. CONCLUSÃO

A amostra de *Babesia canis* estudada demonstrou ter um comportamento biológico similar às outras amostras estudadas nos carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*), em diferentes regiões do mundo. Entretanto, não foram observadas as formas designadas de “strahlenkörper”. Foi verificada ainda, uma acentuada tendência de formação de estágios evolutivos arredondados no organismo do carrapato vetor.

No que se refere à transmissibilidade, não foi observada transmissão de *B. canis* para o cão por larvas de *R. sanguineus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABES, V. 1888. Sur l'hémoglobinure bacterienne du boeuf. *C. R. Acad. Sc.*, 107: 692.

BARREIRA, J. 1988. *Caracterização morfológica , aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de Babesia bovis (Babés, 1888) e Babesia bigemina (Smith & Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em Boophilus microplus (Canestini, 1887)*. Tese Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 103.

BRUMPT, E. 1937. Cycle évolutif de *Piroplasma canis* chez les Ixodines. *C. R. Biol.*, 124:928-931.

- CHRISTOPHERS, S.R. 1907. *Piroplasma canis* and its life cycle in the tick. *Scient. Mem. by Officers Med and Sanit. Departments of the Government of India*, 29:1-83.
- DENNIS, E.W. 1932. The life cycle of *Babesia bigemina* of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus*. *Univ. Calif Pub. Zool.*, 36:263-298.
- EWING, S.A. 1965. Method of reproduction of *Babesia canis* in erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 26:727-733.
- FRIEDHOFF, K.T. & BUSCHER, G. 1976. Rediscovery of Koch's strahlenkörper of *Babesia bigemina*. *Z Parasitenk.*, 50:345-347.
- FRIEDHOFF, K.T. & SMITH, D. 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M. & KREIER, J.P. (Ed.). *Babesioses*. Acad. Press, New York, p. 267-327.
- GONDIN, L.F.P.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA, R.K.; LARANJEIRA, S.H. & FRANCO, S.R.V. 1994. Hepatozoonose canina: descrição de oito casos. *XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, Olinda - Pernambuco, p .161.

HIGUCHI, S.; SIMOMURA, S.; KAWAMURA, S. & YASUDA, Y. 1990.

Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Jpn. J. Parasitol.*, 39:492-496.

HIGUCHI, S.; SIMOMURA, S.; YOSHIDA, H.; HOSHI, F.; KAWAMURA, S. &

YASUDA, Y. 1991. Development of *Babesia gibsoni* in the haemolymph of the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Vet. Med. Sci.*, 53:491-493.

KOCH, R. 1906. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. Zeitschrift für Infektionskrankheiten. *Parasiteire Krankheiten Hyg. Haustiere*, 54:1-9.

LEVINE, N.D. 1971. Taxonomy of the piroplasms. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 90: 2-33.

LOUNSBURY, C.P. 1901. Transmission of malignant jaundice of dog by species of tick. *Agric. J. Cape of Good Hope*, XIX, 714. In: WENYON, C.M. 1926. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*. Vol. II, Baillière, Tindall and Cox, London, p. 1563.

- LOUNSBURY, C.P. 1904. Ticks and malignant jaundice of the dog. J. Comp. Path. & Therap., XVII , 113. In: WENYON, C.M. 1926. *Protozoology. A Manual for Medical Men , Veterinarians and Zoologists*. Vol. II. Bailière, Tindall and Cox, London, p. 1563.
- MALHERBE, W.D. 1968. *A clinicopathological study of Babesia canis infection in dogs*. Thesis of Doctor, Faculty of Vet. Sci., University of Pretoria, 225 p.
- MASSARD, C.A. 1979. *Hepatozoon canis (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) em cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora*. Tese Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, p.121.
- MEHLHORN, H.; MOLTSMANN, V.; SCHEIN, E. & VOIGT, W.P. 1981. Fine structure of supposed gametes and syngamy of *Babesia canis* (Piroplasma) after *in vitro* development. *ZbL Bakr. Hyg. I. Abt. Orig. A .*, 250:248-255.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. & VOIGT, W.P. 1980. Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. *J. Parasitol.*, 66:220-228.

NEITZ, W.O. 1939. The appearance of *Bartonella canis* in a dog suffering from *Rickettsia canis*. *S.A.V.M.A.*, X:103-105.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. 1971. Laboratory investigations on the life cycle on the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Newmann, 1904). *Onderstepoort J Vet. Res.*, 38:215-224.

PARAENSE, W.L. 1949. Verificação da existência de uma fase negativa do sangue no período prepatente da babesiose canina transmitida por carrapatos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 47:367-373.

PURNELL, R.E. 1981. Babesiosis in various hosts. *In*: RISTIC, M. & KREIER, J.P. (Ed.). *Babesiosis*. Acad. Press., New York., p. 25-63.

REGENDANZ, P. 1932. Study on the canine babesiosis (*Babesia canis*) in the tick. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 40:745-748.

REGENDANZ, P. & REICHENOW, E. 1933. Arch. F. Protisten. *In*: SHORTY, H.E. 1936. Life-history and morphology of *Babesia canis* in the dog-tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Ind. J. Med. Res.*, 23:885-920.

- REICHENOW, E. 1935. übertragungsweise mid Entwicklung der Piroplasmen. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektioinskr. Hyg. Abt.*, 1:Orig. 135, 108-119.
- RIBEIRO, L.A. 1995. *Estudo das variações morfológicas de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil*. Tese Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 38.
- RIEK, R.F. 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus*. *Aust. J. Agric. Res.*, /5:802-821.
- RIEK, R.F. 1966. The life of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.*, 17:247-254.
- RUDZINSKA, M.A.; LEWENGRUB, S.; SPIELMAN, A. & PIESMAN, J. 1983. Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J. Protozool.*, 30: 338-346.

- RUDZINSKA, M.A.; SPIELMAN, A.; RIEK, R.F.; LEWENGRUB, S.J. & PIESMAN, J. 1979. Intraerythrocytic “gametocytes” of *Babesia microti* and their maturation in ticks. *Can. J. Zool.*, 57:424-434.
- SARTOR, A.A. 1994. *Aspectos da biologia de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório*. Tese Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 80 p.
- SHEIN, E.; MELHORN, H. & VOIGT, W. 1979. Eletron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Tropica*, 36:229-241.
- SHORTT, H.E. 1936. Life-History and morphology of *Babesia canis* in the dog- tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Ind J. Med. Res.*, 23:885-920.
- SHORRT, H.E. 1973. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. *Int. J. Parasitol.*, 3:119-148.
- SMITH & KILBORNE, 1893. *Bull. U.S. Bur. Anim. Ind.*, 1:177.

- SMITH, R.D.; OSORNO, B.M.; BRENER, J.; DE LA ROSA, R. & RISTIC, M. 1978. Bovine babesiosis: severity and reproductibility of *Babesia bovis* infection induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. *Res. Vet. Sci.*, 24:287-292.
- SOMODA, M.; TAKAHASHI, K.; TAMURA, T. & KOIWA, M. 1978. Studies on canine haemobartonellosis. I. *Haemobartonella canis* detected in the blood of dogs inoculated with *Babesia gibsoni*. *Japanese J. Vet. Sci.*, 40:335- 341.
- ZAPF, F. & SCHEIN, E. 1994a. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma species*. *Parasitol. Res.*, 80:297-302.
- ZAPF, F. & SCHEIN, E. 1994b. New findings in the development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks *Hyalomma species*. *Parasitol. Res.*, 80:543-548.
- WENYON, C.M. 1926. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*. Vol. II, Baillière, Tindall and Cox, London, p. 1563.

WRIGHT, I.C. 1971. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomised dog. *Aust. Vet. J.*, 47:157-159.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1.

INFECÇÃO MÚLTIPLA POR HEMOPARASITOS DE CÃES: RELATO DE UM CASO¹

O'DWYER, L.H., GUIMARÃES, L. & MASSARD, C.L.

INTRODUÇÃO

São vários os agentes patogênicos que são transmitidos ao cão pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), podendo estes estarem associados, parasitando o mesmo animal. Dentre estes agentes, *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) é a mais prevalente, causando muitas vezes doença grave e morte. *Babesia canis* é um protozoário intra-eritrocítico, classificado como uma grande *Babesia*. Apresenta formas variadas, sendo que a forma característica é a piriforme pareada (PURNELL, 1981). São comuns as infecções múltiplas dos eritrócitos, com até 16 merozoítos preenchendo a célula (EWING, 1965). Outro hemoparasito de cão que pode ser encontrado na circulação é o *Hepatozoon canis* (James, 1905). Este protozoário possui um ciclo de vida complexo no hospedeiro vertebrado, com esquizogonias ocorrendo nos tecidos e presença de isogametócitos parasitando neutrófilos na circulação. Ao contrário de outros agentes, é transmitido pela ingestão dos carrapatos infectados, e não pela inoculação de sua saliva (HOSKINS, 1991). Na maioria das vezes, somente os animais que possuem infecções

¹ DPA-IB/UFRRJ; Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Km 47, Seropédica, RJ. 23851-970.
Trabalho apresentado no IX Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 11 a 15 de setembro de 1995, Campo Grande - MS.

concorrentes ou imunossupressão, desenvolvem sinais clínicos (HOSKINS, 1991). No Brasil o *Hepatozoon canis* já foi diagnosticado no Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Rio Grande do Sul, principalmente em áreas rurais (MASSARD, 1979). A *Haemobartonella canis* (Kikuth, 1928) é um organismo rickettsial com localização epieritrocítica. Foi primeiramente descrito por KIKUTH em 1928, em cães esplenectomizados. Raramente causa doença em cães sadios, porém infecções latentes são ativadas por esplenectomia e infecções associadas (HOSKINS, 1991). O uso de drogas imunossupressoras, como por exemplo corticosteróides, também pode provocar o aparecimento de sintomas clínicos (HANDCOCK, 1989). *Haemobartonella canis* é um organismo pleomórfico, aparecendo como formas cocóides, isoladas ou em cadeia, em forma de arco, anel e bengala. As formas arredondadas medem de 0,2 a 0,5 μm (GOYANNES, 1936). Na América do Sul esta rickettsia já foi assinalada em cães no Peru (WEISS & MUZZO, 1936), na Venezuela (VOGELSANG & ESPIN, 1951) e Chile (RUDOLF *et al.*, 1989). No Brasil foi citada por MASSARD *et al.* (1978) e BIONDINI *et al.* (1983).

No presente trabalho observou-se a infecção múltipla por *B. canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios do Departamento de Parasitologia Animal, Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, Instituto de Biologia, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro.

Um cão fêmea, sem raça definida, esplenectomizado e com infecção natural por *Hepatozoon canis*, foi inoculado com sangue de um animal portador de *B. canis*. Os animais procediam das adjacências da UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro. Foram feitas medições diárias de temperatura corporal e confecção de esfregaços sangüíneos, feitos a partir da punção de vasos de pequeno calibre da região auricular. Os esfregaços foram secos ao ar, fixados em metanol por três minutos e corados com Giemsa solução a 10% por 45 minutos. Os esfregaços foram examinados em microscópio ótico, ocular de 10X e objetiva de 100X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quarto dia após a inoculação, foi diagnosticado em esfregaços sangüíneos a presença de *B. canis*, assim como formas cocóides, anulares e em cadeia de *Haemobartonella canis*. KIKUTH (1928) e WRIGHT (1971), já haviam descrito a ocorrência dessas duas parasitoses em cães esplenectomizados. A rickettsia persistiu na circulação por quatro dias consecutivos, ao fim dos quais desapareceu e só voltou a ser encontrada cinco dias depois. A partir de então, o encontro de *Haemobartonella canis* nos esfregaços ocorreu de forma esporádica, o que confirma os achados de KIKUTH (1928) e GOYANES (1936). A infecção por *B. canis* foi persistente, com grau variado de parasitemia. Nove dias após a primeira observação das hemoparasitoses citadas, também foram encontrados neutrófilos parasitados com *Hepatozoon canis*. Este protozoário foi diagnosticado pela primeira vez após a esplenectomia do cão, tendo sido observado desde então de forma esporádica e irregular. Durante todo o período de

acompanhamento, o cão se alimentou normalmente, não demonstrando apatia, apesar de clinicamente apresentar variação de temperatura corpórea (38,5°C a 41,3°C) e sinais de anemia, como palidez de mucosas e alterações morfológicas eritrocitárias, tais como poiquilocitose, anisocitose, hipocromia, corpúsculos de Howell-Jolly e presença de hemácias nucleadas. Este quadro se acentuou com o decorrer do tempo.

A ocorrência da associação de hemoparasitos de cães vem sendo relatada desde o início do século, sendo que a presença dos três parasitos em questão, foi citada por NEITZ (1939). Entretanto, é a primeira vez que a infecção simultânea de um cão com *B. canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* é relatada no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIONDINI, J.; LOPEZ, Z.O.; VIANA, F.A.B. & ARAÚJO, T. 1983. Diagnóstico laboratorial de *Haemobartonella canis* em Belo Horizonte, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 35:743-744.
- EWING, S.A. 1965. Methods of reproduction of *Babesia canis* in erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 26:727-733.
- GOYANES, D.J. 1936. Aspects morphologiques de *Bartonella canis*. *Annales de Parasitologie*, XIV, 5:423-428.
- HANDCOCK, W.J. 1991. Clinical haemobartonellosis, Canine Hepatozoonosis and Feline Cytauxzoonosis. In: HOSKINS, J.D. (Ed.). *Small Animal Practice-Tick transmitted diseases*. Saunders Company. Philadelphia, p. 129-140.
- HOSKINS, J.D. 1991. Canine Haemobartonellosis, Canine Hepatozoonosis and Feline Cytauxzoonosis. In: HOSKINS, J.D. (Ed.). *Small Animal Practice-Tick Transmitted Diseases*. Saunders Company, Philadelphia, p. 129-140.

- KIKUTH, W. 1928. Ueber einer neuer Anemie-erreger *Bartonella canis* nov. sp. *Win. Woch.*, 7:1729-1730.
- MASSARD, C. de A. 1979. *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) em cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. Tese de Mestrado, UFRRJ, 121 p.
- MASSARD, C.L.; REZENDE, H.E.B.; MASSARD, C. de A. & SERRA FREIRE, N.M. 1978. Observações sobre *Haemobartonella canis* (Kikuth, 1928) (Microtatiobiotas: Rickettsiales) em canídeos domésticos no Estado do Rio de Janeiro. Anais do II Cong. Soc. Bras. Parasitologia, João Pessoa, Paraíba.
- NEITZ, W.O. 1939. The appearance of *Bartonella canis* in a dog suffering from *Rickettsia canis*. *S.A.V.M.A.*, X:103-105.
- PURNELL, R.E. 1981. Babesiosis in various hosts. In: RISTIC, M. & KREIER, J.P. (Ed.). *Babesiosis*. Acad. Press., New York, p. 25-63.
- RUDOLPH, R.W. ; MORA, L. & SEGOVIA, P. 1989. *Haemobartonella canis* in a diseased dog in Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 4:75-76.
- VOGELSANG, E.G. & ESPÍN, I. 1951. *Bartonella canis* (Kikuth, 1928) en caninos de Venezuela. *Rev. Med. Vet. Parasit.*, V11:1-2.
- WEISS & MUZZO. 1936. In: WEINMAN, D. & PINKERTON, H. 1937. Carrion's disease IV. Natural sources of *Bartonella* in the endemic zone. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 37:596-598.
- WRIGHT, I.G. 1971. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomised dog. *Aust. Vet. Journal*, 47:157-159.

APÊNDICE 2.

TRANSMISSÃO BIOLÓGICA DE *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALERIO, 1895) POR NINFAS E ADULTOS DE *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)²

O'DWYER, L.H., GUIMARÃES, L. & MASSARD, C.L.

INTRODUÇÃO

Aspectos biológicos da transmissão das várias espécies de *Babesia* pelos seus diferentes vetores, vêm sendo estudados por inúmeros autores. Em algumas espécies, o modo de transmissão está bem esclarecido. *Babesia bigemina* é transmitida pelos estágios de ninfa e adultos de *Boophilus microplus*, inclusive machos, sendo que as fêmeas são as únicas capazes de adquirir a infecção (DALGLIESH *et al.*, 1978; FRIEDHOFF & SMITH, 1981). Ao contrário, somente as larvas de *B. microplus* são capazes de transmitir *B. bovis*, perdendo a infecção após a transmissão (MAHONEY & MIRRE, 1979). Deste modo, os estágios subseqüentes de ninfas e adultos não estão infectados. Para esta espécie de *Babesia* ocorre somente a transmissão transovariana e novamente, a fêmea é o único estágio que adquire o protozoário (FRIEDHOFF & SMITH, 1981). A transmissão de *Babesia* por via oral é uma outra possibilidade, como foi demonstrado por MALAGON & TAPIA (1994) para *B. microti*.

² DPA-IB/UFRRJ; Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Km 47, Seropédica, RJ. 23851-970.

¹ Trabalho apresentado no IX Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 11 a 15 de setembro de 1995, Campo Grande - MS.

Em relação a *B. canis*, algumas dúvidas ainda persistem quanto aos estágios de *Rhipicephalus sanguineus* que adquirem e transmitem a infecção. SHORTT (1973) conseguiu transmitir *B. canis* com larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*. Os adultos, tanto machos quanto fêmeas, são os transmissores mais eficientes, enquanto as larvas só transmitem quando grande número é utilizado (REICHENOW, 1935). Outro fator limitante para a transmissão de *B. canis* por larvas de *R. sanguineus* é a temperatura de manutenção dos carrapatos, que deve ser inferior à 28°C (SHORTT, 1973).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local do Experimento

O experimento foi realizado nos laboratórios do Departamento de Parasitologia Animal, Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EPPWON), Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

2. Obtenção de carrapatos livres de *Babesia canis*

Foi utilizada uma colônia de carrapatos de *R. sanguineus* mantida em laboratório e alimentada em coelhos por sete gerações, no Laboratório de Ixodologia na EPPWON. Fêmeas ingurgitadas desta colônia tiveram suas hemolinfas examinadas no 10º dia após o desprendimento natural, para verificação da presença de *B. canis*, sendo todas negativas. Só então as progênes dessas fêmeas foram usadas no experimento. Todos os instares de carrapatos foram mantidos em estufa biológica BOD, à 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa superior

a 80% e escotofase.

Para confirmar a negatividade dos carrapatos, um cão esplenectomizado, negativo para *B. canis* e portanto sensível à mesma, foi infestado segundo adaptação da técnica de NEITZ et al. (1971). Esse cão foi acompanhado diariamente através de esfregaços sangüíneos fixados pelo metanol e corados pelo Giemsa, para verificação de possível transmissão de *Babesia* pelos carrapatos. O animal permaneceu negativo. As fêmeas ingurgitadas assim obtidas tiveram suas hemolinfas examinadas e não se mostraram infectadas, demonstrando que os carrapatos utilizados no experimento estavam realmente livres do protozoário.

3. Infestação de cães positivos

Dois cães positivos e com parasitemia para *B. canis* receberam aproximadamente 5000 larvas e 200 ninfas de *R. sanguineus*, segundo técnica de NEITZ et al. (1971). Após o ingurgitamento e desprendimento dos dois instares, os carrapatos foram mantidos em BOD, a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa superior a 80% e escotofase. Após ecdise, as ninfas e adultos foram utilizados na transmissão.

4. Infestação de cães negativos para Babesia

Foram utilizados dois cães jovens, negativos para *Babesia* e mantidos livres de carrapatos. O primeiro cão foi infestado com 200 ninfas e o segundo, com 50 machos e 50 fêmeas de *R. sanguineus*, obtidos conforme descrito no item 3. Os animais foram monitorados diariamente com medições de temperatura retal e esfregaços sangüíneos confeccionados a

partir da punção de vasos de pequeno calibre da região auricular. Os esfregaços foram secos ao ar, fixados em metanol por três minutos e corados com Giemsa solução a 10% por 45 minutos. Os esfregaços foram examinados em microscópio óptico, ocular de 10x e objetiva de 100x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cão 1 apresentou esfregaços sangüíneos positivos para *B. canis* nove dias após a infestação com ninfas, antes mesmo de apresentar elevação de temperatura corporal. O cão 2, infestado com adultos, apresentou elevação de temperatura cinco dias após a colocação dos carrapatos, e esfregaços de sangue positivo, seis dias após. Fêmeas ingurgitadas neste animal, tiveram suas hemolinfas examinadas e muitas estavam positivas.

O experimento realizado demonstrou a transmissão de *B. canis* por ninfas e adultos de *R. sanguineus*, confirmando os dados de SHORTT (1973) e FRIEDHOFF & SMITH (1981), que afirmaram que todos os instares deste carrapato podem transmitir o protozoário em questão. Os adultos mostraram-se melhores transmissores, devido ao menor período pré-patente, o que está de acordo com FRIEDHOFF & SMITH (1981). Nossos resultados indicam que tanto larvas quanto ninfas foram capazes de adquirir a infecção, discordando dos autores citados que dizem que somente as fêmeas podem adquirir o protozoário, transmitindo às gerações seguintes via transovariana. Outros estudos estão sendo conduzidos a fim de caracterizar as infecções transovarianas e intraestadiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P. & CALLOW, L.L. 1978. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. Journal*, 54:205-206.
- FRIEDHOFF, K.T. & SMITH, R.D. 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M. & KREIER, J.P. (Ed.). *Babesiosis*. Acad. Press., New York, p. 267-321.
- MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. 1979. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.*, 26:253-254.
- MALAGON, F. & TAPIA, J.L. 1994. Experimental transmission of *Babesia microti* infection by the oral route. *Parasitol. Res.*, 80:645-648.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. 1971. Laboratory investigations of the life cycle of the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus*, Neumann, 1904). *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 38:215-224.
- REICHENOW, E. 1935. Übertragungsweise and Entwicklung der Piroplasmen. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.*, 1:Orig. 135, 108-119.
- SHORTT, H.E. 1973. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. *Int. J. Parasitol.*, 3:119-148.